

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.254.22

А. О. Колоян, С. В. Аветисян, М. Г. Паронян, А. С. Овсепян

Применение гена *argJ* термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* для конструирования высокоактивного штамма-продуцента аргинина

(Представлено чл.-кор. НАН РА Р. М. Арутюняном 7/VI 2021)

Ключевые слова: ген *argJ*, *Geobacillus stearothermophilus*, молекулярное клонирование, рекомбинантная плазмида, коринеформные бактерии, штамм-продуцент.

Микробиологическое производство аминокислот, в том числе и L-аргинина, является одной из ведущих отраслей современной биотехнологической промышленности. Получение новых перспективных высокоактивных продуцентов аминокислот с улучшенными биосинтетическими показателями является актуальной задачей. В этой области новые возможности открыла методология геной инженерии. В микробиологическом производстве аминокислот традиционно используются коринеформные бактерии, обладающие высокими технологическими характеристиками.

При разработке подходов создания рекомбинантных штаммов, обеспечивающих повышенный синтез L-аргинина, представляется целесообразным проведение молекулярного клонирования *arg* генов в клетках коринеформных бактерий. Экспрессия этих генов под контролем собственных или гетерологичных сильных промоторов, не подверженных регуляции конечным продуктом, приводит к повышению синтетической активности и улучшению технологических характеристик штаммов-продуцентов.

У коринеформных бактерий ген *argJ* кодирует синтез монофункционального фермента орнитинацетилтрансферазы (EC 2.3.1.35, ОАТ), функция которой заключается в превращении N-ацетилорнитина в орнитин переносом ацетилгруппы на глутаминовую кислоту с образованием N-ацетилглутамата [1 – 3]. Однако было показано, что ОАТ действует как бифункциональный фермент, который катализирует две активности цик-

лического пути биосинтеза аргинина: синтез N-ацетилглутамата из глутаминовой кислоты и ацетил-CoA, а также образование орнитина трансацилированием между N-ацетилорнитином и глутаминовой кислотой – и играет существенную роль в процессе биосинтеза L-аргинина [4].

Молекулярное клонирование гетерологичного гена *argJ* в клетках коринеформных бактерий представляется интересным, так как кодируемый этим геном бифункциональный фермент ОАТ ингибируется метаболическим интермедиатом L-орнитином, а конечный продукт биосинтеза L-аргинин на его активность не влияет [5].

Целью представленной работы является молекулярное клонирование гетерологичного гена *argJ* *G. stearothermophilus*, экспрессия которого находится под контролем сильного промотора *Ptrc*, в клетках коринеформной бактерии и создание новых высокоактивных аргининсинтезирующих рекомбинантных штаммов *Br. flavum*.

Материалы и методы исследований. В работе были использованы штаммы: *Br. flavum* НК-19А (ile⁻, D-ser^s, ArgHx^r, TA^r, коллекционный номер по ЦДМ – ИНМИА 11834) [6], *C. glutamicum* (arg⁻), *E. coli* XA4 (F⁻ *argA* *nalA* λ λ^S *trpR* *hsdR*), *E. coli* XS1D2R (F⁻ Δ (*ppc-argE*)101 *nalA* *rpoB* λ *hsdR* *recA*), *G. Stearothermophilus* NCIB 8224 (дикий тип), а также *E. coli* – *C. glutamicum* челночный экспрессионный вектор pEC-ХК99Е (GenBankAY219683).

Для выращивания бактериальных штаммов, принадлежащих к родам *Brevibacterium* и *Corynebacterium*, в качестве полноценных сред использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) следующего состава: пептон – 10 г, NaCl – 5 г, мясная вода – 1 л, и мясо-пептонный агар (МПА), который получали добавлением 16-18 г/л агара («Difco», США) в состав МПБ. Использовали также полноценные среды CASO-бульон и CASO-агар («Merck», Германия).

Синтетической средой для культивирования штаммов *Br. flavum* и *C. glutamicum* послужила среда Гловера следующего состава, %: NH₄Cl – 0.5; NH₄NO₃ – 0.1; Na₂SO₄ – 0.2; K₂HPO₄ – 0.3; KH₂PO₄ – 0.1; MgSO₄×7H₂O – 0.025; FeSO₄×7H₂O – 0.001; MnSO₄×5H₂O – 0.001; агар «Difco» – 1.6; глюкоза – 0.8, а также биотин – 100 мкг/л; тиамин – 100 мкг/л; L-аминокислоты – 40 мкг/мл.

Для выращивания штаммов *E. coli* и *G. stearothermophilus* в качестве полноценной среды были использованы среды Luria-Bertani (LB) LB-бульон и LB-агар [7]. В качестве синтетической среды для культивирования штаммов *E. coli* были использованы жидкий и агаризованный М9 с необходимыми добавками [7]. L-аминокислоты в М9 добавлялись в концентрации 40 мкг/мл. При необходимости в среду добавляли канамицин (Km) до конечной концентрации 50 мкг/мл. Выделение хромосомной ДНК из *G. stearothermophilus* проводилось в соответствии со следующим протоколом [8]. Выделение и очистку плазмидной ДНК осуществляли по протоколу QIAGEN (Германия) с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit.

Для анализа ДНК использовали 1% агарозный гель, приготовленный на Tris-ацетатном буфере [9]. Электрофорез осуществляли в условиях 80 вольт в горизонтальном приборе «MINI-SUBCELLGT» («Bio-Rad», США). ДНК проявляли бромистым этидием (0.0001% в геле) и анализировали под УФ лучами прибора «FOTODYNEInc.» (США) [9]. Амплификацию проводили с использованием следующих этапов: начальная денатурация в течение 5 мин при 94°C; 30 циклов: денатурация (30 с при 94°C), «отжиг» (30 с при 52°C), синтез (2 мин при 72°C); окончательный синтез (7 мин при 72°C). Амплификацию ДНК подтверждали электрофорезом. Выделение и очистку полученных PCR-фрагментов из агарозного геля осуществляли по протоколу QIAGEN с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit. Клонирование PCR-фрагментов проводили по протоколу ТА-клонирования «Invitrogen» с использованием PCR4-TOP10-вектора. Рестрикцию проводили согласно протоколу «New England Biolabs» (США). Использовали эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *BamHI*. Лигирование проводили согласно протоколу «New England Biolabs» с использованием набора Quick Ligation Kit и Quick T4 DNA ligase. Трансформация клеток *E. coli* проводили по известному методу [9]. Трансформацию клеток *Br. flavum* (электропорацию) проводили по описанной методике с некоторыми модификациями [10]. Электропорация была осуществлена при помощи аппарата, изготовленного в НПП «Армбиотехнология», в следующих условиях: 320 вольт, 40 микрофарад.

Способность штаммов к повышенному синтезу L-аргинина определяли микробиологическим методом. Колонии испытуемых культур наносили штрихами на минимальную среду Гловера, засеянную тест-культурой, ауксотрофной по аргинину. Способность продуцировать аргинин оценивали по наличию и размерам зоны роста тест-культуры вокруг анализируемых колоний (штрихов) [11].

Для проведения колбочной ферментации отдельные колонии *Br. flavum* переносили в МПБ или CASO-бульон и выращивали в пробирках в течение 16-18 ч при температуре 30°C. Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера с емкостью 500 мл с 14 мл ферментационной среды и 1 мл посевного материала на качалке при 220-240 об/мин при температуре 31°C в течение 72 ч.

Для определения аргининпродуцирующей способности была использована ферментационная среда следующего состава, %: сахароза – 15.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5.5; KH_2PO_4 – 0.3; рыбная паста – 1.2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0/001; CaCO_3 – 5.0; биотин – 500 мкг/л; тиамин – 500 мкг/л; L-изолейцин – 300 мкг/мл (pH 7.6) [12].

Количественное определение L-аргинина в культуральной жидкости проводили колориметрически по модифицированному методу Сакагучи, основанному на специфическом окрашивании диацетила с гуанидиновой группой аргинина в присутствии 8-оксихинолина в щелочной среде [13]. Раствор диацетила в пропиловом спирте в присутствии 8-оксихинолина в щелочной среде при наличии аргинина обеспечивал стабильную окраску. Измерение прово-

дили на спектрофотометре 550SUV / VIS (Perkin-Элмер, США) при длине волны $\lambda = 540$ нм.

Количественное определение L-аргинина и сопутствующих аминокислот проводили также с помощью аминокислотного анализатора «Shimadzu Nexera X2» (Япония). Нуклеотидная последовательность клонированного гена *argJ* *G. stearothermophilus* опубликована на сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Статистические параметры (средняя величина, стандартное отклонение), используемые в экспериментах, вычислены при помощи программы MS Excel.

Результаты исследований. Молекулярное клонирование гена *argJ* *G. stearothermophilus* было осуществлено при помощи *E. coli* – *C. glutamicum* челночного экспрессионного вектора pEC-ХК99Е, основанного на среднекопийной плазмиде pGA1 (4,9 т.п.н.) [14]. Вектор pEC-ХК99Е размером 7,02 т.п.н. содержит полилинкер (mcs) с 13 сайтами для рестрикционных эндонуклеаз, сильный промотор *P_{trc}*, а также включает в себя ген устойчивости к канамицину (*aph(3')-Ila*) [15].

Матрицей для амплификации гена *argJ* послужила хромосомная ДНК *G. stearothermophilus* NCIB 8224. Амплификацию проводили с помощью PCR.

Для амплификации гена *argJ* использовались следующие праймеры:

Forward

5'-CCG**GAATTC**ACGATCACAAAACAAACGGG

EcoRI

Reverse

5'-CGC**GGATC**CTTACGTCCGATAGCTGGCG

BamHI

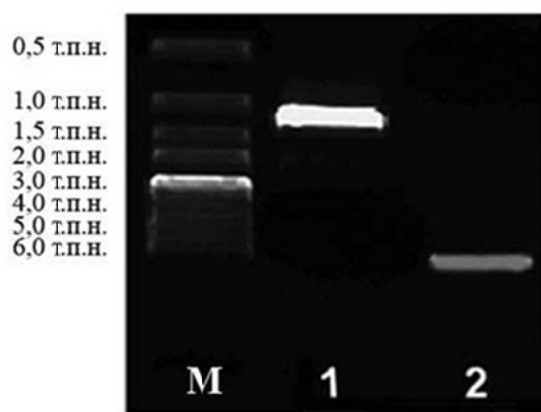


Рис. 1. Электрофореграмма PCR-продукта гена *argJ* *G. stearothermophilus* и вектора pEC-ХК99Е: М – ДНК ladder; 1 – PCR-продукт гена *argJ* *G. stearothermophilus* размером ~ 1250 п.н.; 2 – вектор pEC-ХК99Е размером 7,02 т.п.н., обработанный ферментами *EcoRI*/*BamHI*.

Размер PCR-продукта гена *argJ* *G. stearotherophilus* составил ~ 1250 п.н. Полученный PCR-продукт гена *argJ* *G. stearotherophilus* (рис. 1) был экстрагирован из геля и клонирован на вектор pEC-XK99E (под контроль промотора *P_{trc}*), предварительно обработанный рестрикционными ферментами *EcoRI/BamHI*. Лигированной смесью были трансформированы компетентные клетки штаммов *E. coli* XA4 и *E. coli* XS1D2R, мутантные по генам *argA* и *argE*, соответственно. Поскольку продукт гена *argJ* *G. stearotherophilus* является бифункциональным ферментом [5], то он в клетках *E. coli* комплементирует две разные мутации – *argA*⁻ и *argE*⁻. Отбор трансформантов вели по комплементации мутантных генов *argA* и *argE* штаммов *E. coli* XA4 и *E. coli* XS1D2R, соответственно, на селективной среде M9 без аргинина в присутствии Km (50 мкг/мл).

После инкубации с чашек были отобраны прототрофные и устойчивые к Km (Km^r) трансформанты штаммов *E. coli* XA4 и *E. coli* XS1D2R. С целью подтверждения присутствия гена *argJ* в составе сконструированной рекомбинантной плазмиды из трансформантов была выделена плазмидная ДНК, которой повторно трансформированы клетки штаммов *E. coli* XA4 (*argA*⁻) и XS1D2R (*argE*⁻). Из выросших на селективной среде M9 без аргинина в присутствии Km (50 мкг/мл) трансформантов была выделена плазмидная ДНК. Для выяснения структурной организации рекомбинантной плазмиды pARGJ (рис. 2), содержащей ген *argJ* *G. Stearotherophilus*, был проведен рестрикционный анализ этой плазмиды. Для этого плазмиду pARGJ обработали рестрикционными ферментами *EcoRI/BamHI*. Электрофореграмма рестриктов этой плазмиды представлена на рис. 3.

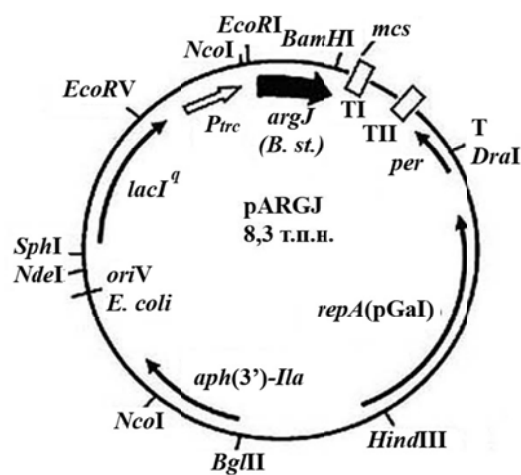


Рис. 2. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды pARGJ. Жирной стрелкой обозначен ген *argJ* *G. stearotherophilus*.

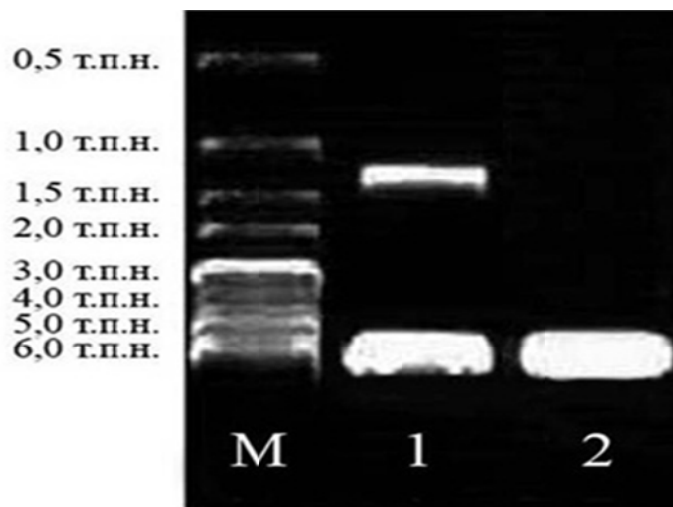


Рис. 3. Электрофореграмма рестрикетов рекомбинантной плазмиды pARGJ и вектора pEC-XK99E: М– DNA ladder; 1 – *EcoRI/BamHI* рестрикты рекомбинантной плазмиды pARGJ; 2 – *EcoRI/BamHI* рестрикт вектора pEC-XK99E.

Таким образом, наличие клонированного гена *argJ* в составе сконструированной рекомбинантной плазмиды pARGBJ было подтверждено результатами комплементации мутаций *argA* и *argE* генов в ауксотрофных штаммах *E. coli* XA4 (*argA*[−]) и *E. coli* XS1D2R (*argE*[−]), а также рестрикционным анализом этой плазмиды.

С целью создания новых рекомбинантных штаммов коринеформных бактерий, продуцирующих L-аргинин, сконструированная нами плазмида, несущая гетерологичный ген *argJ*, а также вектор pEC-XK99E (в качестве контроля) методом электропорации были перенесены в ранее полученный нами штамм-реципиент *Br. flavum* НК-19А [10]. Отбор трансформантов вели на полноценной среде в присутствии Km (50 мкг/мл).

Отобранные после трансформации колонии проверялись на аргинин-продуцирующую способность. Сначала трансформанты отбирались микробиологическим методом с использованием *C. glutamicum* arg[−] тест-культуры [11]. Способность продуцировать аргинин оценивали по наличию и размерам зоны роста тест-культуры вокруг анализируемых колоний. После микробиологической проверки отобранные варианты, образовавшие сравнительно большие зоны роста arg[−] тест-культуры вокруг анализируемых колоний, проверялись на аргининсинтезирующую активность в условиях колбочной ферментации на питательной среде.

Полученные нами данные (рис. 4) показали, что присутствие гетерологичного гена *argJ* *G. stearothermophilus* в составе рекомбинантной плазмиды приводит к повышению синтеза L-аргинина у сконструированного нами штамма-реципиента.

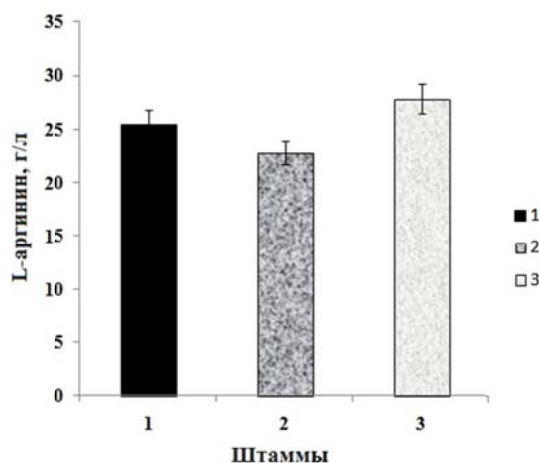


Рис. 4. Количество синтезированного L-аргинина штаммом-реципиентом и рекомбинантными штаммами: 1 – штамм-реципиент *Br. flavum* НК-19А; 2 – рекомбинантный штамм *Br. flavum* НК-19А (pEC-XK99E), содержащий вектор; 3 – рекомбинантный штамм *Br. flavum* НК-19А (pARGJ), содержащий плазмиду.

Закключение. Таким образом, в результате проведенной нами работы осуществлено молекулярное клонирование гетерологичного гена *argJ* *G. stearothermophilus* и изучена экспрессия этого гена в клетках коринеформных бактерий. Сконструирован новый рекомбинантный штамм *Br. flavum* НК-19А (pARGBJ).

Рекомбинантная плазмида pARGJ, несущая ген *argJ*, продукт которой не ингибируется L-аргинином, увеличивает аргининпродуцирующую способность штамма *Br. flavum* НК-19А на 5.0 г/л по сравнению с тем же штаммом, содержащим вектор pEC-XK99E.

НПЦ «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА
e-mail: anichka_h@mail.ru

А. О. Колоян, С. В. Аветисян, М. Г. Паронян, А. С. Овсепян

Применение гена *argJ* термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* для конструирования высокоактивного штамма-продуцента аргинина

Осуществлено молекулярное клонирование гена *argJ* термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* на *Escherichia coli* – *Corynebacterium glutamicum* челночном экспрессионном векторе pEC-XK99E в клетках коринеформных бактерий. Сконструированная рекомбинантная плазмида pARGJ была использована для создания нового штамма-продуцента аргинина. В качестве реципиента использован полученный нами ранее штамм *Brevibacterium flavum* НК-19А, синтезирующий до 25.0 г/л L-аргинина. Созданный новый рекомбинантный штамм, содержащий гетерологичный ген *argJ* термофильной бактерии, обеспечивает

более высокий выход (на 20%) L-аргинина по сравнению со штаммом-реципиентом.

Հ. Օ. Քոլոյան, Ս. Ո. Ավետիսյան, Մ. Հ. Պարոնյան, Ա. Ս. Հովսեփյան

***Geobacillus stearothermophilus* թերմոֆիլ մանրէի *argJ* գենի կիրառումը արգինինի բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչի կառուցման համար**

Իրականացվել է *Geobacillus stearothermophilus* թերմոֆիլ մանրէի *argJ* գենի մոլեկուլային կլոնավորումը *Escherichia coli* – *Corynebacterim glutamicum* մաքուրային էքսպրեսիոն վեկտորի վրա կորինեֆորմ բակտերիաների բջիջներում: Կառուցված pARGJ ռեկոմբինանտ պլազմիդն օգտագործվել է արգինինի նոր շտամ արտադրիչ ստանալու համար: Որպես շտամ ռեցիպիենտ օգտագործվել է մեր կողմից նախկինում ստացված մինչև 25.0 գ/լ L-արգինին սինթեզող *Brevibacterium flavum* HK-19A շտամը: Թերմոֆիլ մանրէի հետերոլոգ *argJ* գենը կրող նոր կառուցված ռեկոմբինանտ շտամը շտամ ռեցիպիենտի համեմատ ապահովում է L-արգինինի ավելի բարձր ելք (20%-ով):

H. O. Koloyan, S. V. Avetisyan, M. H. Paronyan, A. S. Hovsepyan

Application of the *argJ* Gene of the Thermophilic Bacterium *Geobacillus stearothermophilus* for the Construction of a Highly Active Arginine-Producing Strain

Molecular cloning of the gene *argJ* of thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus* on *Escherichia coli* - *Corynebacterim glutamicum* shuttle expression vector pEC-XK99E in the cells of coryneform bacteria was carried out. To create a new arginine- producing strain, the constructed recombinant plasmid pARGJ was used. As a recipient, we used the previously obtained *Brevibacterium flavum* HK-19A strain, which synthesizes up to 25.0 g/L of L-arginine. The created new recombinant strain containing the heterologous gene *argJ* of the rmophilic bacterium provides higher yield (by 20%) of L-arginine compared to the recipient strain.

Литература

1. Sakanyan V., Petrosyan P., Lecocq M. et al. – Microbiology. 1996. V. 142. P. 99-108.
2. Hwang G. H., Cho J. Y. – J Ind Microbiol Biotechnol. 2010. V. 37. P.1131-1136.
3. Shin J. H, Lee S. Y. – Microb Cell Fact. 2014. 13:166. doi: 10.1186/s12934-014-0166-4.
4. Marc F., Weigel P., Legrain C. et al.– Eur J Biochem. 2000. V. 267. P 5217-5226.
5. Sakanyan V., Charlier D., Legrain C. et al.– J Gen Microbiol. 1993. V. 139. P. 393-402.
6. Коляян А. О. – Биолог. журн. Армении. 2006. Т. 58. № 1-2. С. 29-33.

7. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* – Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982. 545 p.
8. *Zhu H., Qu F., Zhu L. H.* – Nucleic. Acids Res. 1993. V. 21. № 22. P. 5279-5280.
9. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* – Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 2nd edn, V. 1-3, 1626 p.
10. *Dunican L. K., Shivnan E.* – Bio/Technology. 1989. V. 7. P. 1067-1070.
11. *Чахалян А. Х., Келециян С. К., Карапетян Ж. В. и др.* – Биолог. журн. Армении. 2008. Т. 60. № 1-2. С. 103-108.
12. *Колоян А. О., Овсепян А. С.* – Биолог. журн. Армении. 2009. Т. 6. № 13. С. 38-44.
13. *Rosenberg H., Ennor A. H., Morrison J. F.* – Biochem. J. 1956. V. 63. P. 153-159.
14. *Nešvera J., Pátek M., Hochmannová et al.* – J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 1525-1532.
15. *Kirchner O., Tauch A.* – J. Biotechnol. 2003. V. 104. P. 287-299.