

**Международная школа - конференция**

**«Генетика микроорганизмов  
и биотехнология»**

**посвященная 40-летию  
Государственного научно-  
исследовательского института генетики и  
селекции промышленных  
микроорганизмов (ГосНИИгенетика)**

**20 – 24 октября 2008 г.  
Москва - Пущино**

# Содержание

## Научные доклады

Д-1	<b>Активный транспорт метаболитов из клеток бактерий: физиологическая роль и практическое применение</b> Лившиц В. А., Закатаева Н.П.	13
Д-2	<b>Эволюционная генетика и таксономия дрожжевых организмов</b> Наумов Г.И.	14
Д-3	<b>C-di-GMP - глобальная сигнальная молекула, регулирующая биопленки и вирулентность бактерий</b> Рыженков Д.А., Шмидт Э., Тарутина М., Москвин О.В., Гомельский М.	15
Д-4	<b>Экспрессия белков в метилотрофных дрожжах – экономичный путь производства лекарств нового поколения, ферментов и диагностических средств</b> Толсторуков И.И.	16

## Постерные сообщения

П-1	<b>Сравнительный анализ плазмид штаммов – деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Serratia</i></b> Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В.	18
П-2	<b>Влияние факторов транскрипции TngA и CodY на экспрессию гена глутамилэндопептидазы <i>B. intermedius</i> в рекомбинантных штаммах <i>B. subtilis</i></b> Ахметова А.И., Каюмов А.Р., Шарипова М.Р.	19
П-3	<b>Участие адаптивного мутагенеза в появлении устойчивых к рифампицину мутантов у <i>Salmonella typhimurium</i></b> Бабынин Э.В., Ушакова Л.С.	20
П-4	<b>Выявление лучших форм селективного агента для проведения селекции пшеницы к грибному патогену в условиях <i>in vitro</i> (<i>Triticum aestivum</i> L.)</b> Беккужина С.С.	21
П-5	<b>Роль некоторых глобальных регуляторов экспрессии генов в процессе образования биопленок и синтеза АИ-2 клетками <i>Escherichia coli</i></b> Белик А.С., Завильгельский Г.Б., Хмель И.А.	22
П-6	<b>Оценка β-галактозидазной активности микроорганизмов, используемых при изготовлении ферментированных молочных продуктов</b> Богданова Л.Л., Сапунова Л.И., Василенко С.Л., Тамкович И.О., Дудко Н.В., Сафроненко Л.В.	23

П-7	<b>Биокаталитический синтез диаденозин-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфата</b> Бурко Д.В., Квач С.В., Зинченко А.И.	24
П-8	<b>Характеристика почвенных нафталинутилизирующих бактерий, выделенных на территории Беларуси</b> Василенко С.Л., Чернова А.И., Лагодич А.В., Титок М.А.	25
П-9	<b>VIR-обусловленный перенос производных плазмиды RSF1010 между агробактериями и энтеробактериями</b> Великов В.А.	26
П-10	<b>Селекция мутаций в гене <i>recA</i>, повышающих радиоустойчивость <i>Escherichia coli</i></b> Вербенко В.Н., Кузнецова Л.В., Крупьян Е.П., Суслов А.В., Шалгуев В.И.	27
П-11	<b>Исследование влияния ассоциации микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти на биометрические характеристики растений в модельных системах, загрязненных нефтью</b> Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Филонов А.Е.	28
П-12	<b>Экспресс-анализ гербиаса в культуральных жидкостях методом электроосмотической тонкослойной хроматографии</b> Воейкова Т.А., Антонова С.В., Тяглов Б.В., Барсуков Е.Д., Сизова И.А., Малахова И.И., Красиков В.Д.	29
П-13	<b>Анализ генетических и физиолого-биохимических характеристик стрептомицетов в космическом полете на беспилотном аппарате «Фотон М-3»</b> Воейкова Т.А., Емельянова Л.К., Тяглов Б.В., Новикова Л.М., Goins T.L., Pyle B.H.	30
П-14	<b>Эффективная система скрининга мутаций, нарушающих функцию формирования трансмембранного канала у энтомоцидных Сгу-белков, на основе мониторинга токсичности при экспрессии в клетках <i>Escherichia coli</i></b> Воюшина Н.Е., Левитин Е.И., Залунин И.А., Честухина Г.Г.	31
П-15	<b>Создание продуцента липазы BTL2 на основе дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i></b> Выборная Т.В.	32
П-16	<b>Модификации процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антиген-связывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител</b> Вятчанин А.С., Тиллиб С.В.	33
П-17	<b>Филогенетический анализ гликозил-гидролаз семейства GH70</b> Гизатуллина Д.И., Наумов Д.Г.	34
П-18	<b>Нано- и микрочастицы из конденсированной ДНК, образующиеся в ходе полимеразной цепной реакции</b> Данилевич В.Н., Кадыков В.А., Гришин Е.В.	35
П-19	<b>Адаптивный мутагенез в системе ранних генов биосинтеза пуринов <i>de novo</i> метилотрофных дрожжей <i>Pichia methanolica</i> МН4</b> Дутова Т.А., Мордкович Н.Н., Цыганков Ю.Д.	36

П-20	<b>Получение внутриклеточной аминоклазы <i>Escherichia coli</i></b> Епремян А.С., Арцруни Г. К.	37
П-21	<b>Роль районов 1.1 и 3.2 сигма-субъединицы РНК-полимеразы <i>Thermus thermophilus</i> в инициации транскрипции</b> Жилина Е.В., Басс И.А., Кульбачинский А.В.	38
П-22	<b>Свойства глюкозооксидазы рекомбинантного штамма <i>Penicillium adametzii</i> ЛФ F-2044.1.17</b> Жуковская Л.А., Михайлова Р.В., Семашко Т.В., Лобанок А.Г.	39
П-23	<b>Бисенсорная установка проточно-инжекционного типа на основе иммобилизованной алкогольоксидазы для экспресс - определения спиртов</b> Зайцев М.Г., Кузнецова Т.А., Решетилов А.Н., Рогова Т.В.	40
П-24	<b>Действие препаратов нитрофуранового ряда на <i>Quorum Sensing</i> и формирование биопленок у грамотрицательных бактерий</b> Зайцева Ю.В., Белик А.С., Хмель И.А.	41
П-25	<b>Влияние компонентов пробиотических микроорганизмов на активность роста и адгезивные свойства <i>Bifidobacterium adolescentis</i> 94 БИМ и <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i></b> Ижик А.В., Новик Г.И., Рахуба Д.В., Сидоренко А.В., Михайлопуло К.И.	42
П-26	<b>Практическое использование специфических микроорганизмов для трансформации целлюлозосодержащего сырья</b> Касаткина А.Н., Градова Н.Б., Ушакова Н.А.	43
П-27	<b>Исследование влияния компонентов ростовой среды и интермедиатов клеточного метаболизма на активность НАД-зависимой малат-дегидрогеназы (декарбоксилирующей) из <i>E. coli</i></b> Киверо А.Д., Смирнов С.В.	44
П-28	<b>Генетический перенос и экспрессия <i>elt</i>-оперона <i>E. coli</i> внутри семейства <i>Enterobacteriaceae</i> и за его пределами</b> Козловский Ю.Е., Алексанкин А.П., Степанов С.А., Абрамов О.И., Серебряков С.Н., Козловская Г.В., Тинаева Е.А.	45
П-29	<b>Распространение способности к продукции цитотонических токсинов в популяциях энтеробактерий</b> Козловский Ю.Е., Плугина И.В., Степанов С.А., Емельяненко П.А., Козловская Г.В., Алексанкин А.П., Хомякова Т.И.	46
П-30	<b>Пробиотические препараты с антитоксической активностью на основе резидентной микрофлоры</b> Козловский Ю.Е., Тихонова Н.Б., Емельяненко П.А., Плугина И.В., Серебряков С.Н., Овчарова А.Н., Козловская Г.В., Тинаева Е.А.	47
П-31	<b>Генетическое родство дрожжей <i>Zygowillioopsis</i>: новые виды</b> Кондратьева В.И., Наумова Е.С., Наумов Г.И.	48
П-32	<b>Технология производства рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в промышленных масштабах</b> Кононова Н.В., Бобрусин А.И., Косарев С., Пучков И.А., Свешникова Е.В., Демин А.В., Баирамашвили Д.И.	49

П-33	<b>Сравнение уровня экспрессии и эффективности очистки рекомбинантного ИФН-<math>\alpha</math>-2b человека с полигистидиновой системой и без неё</b> Кособокова Е.Н.	50
П-34	<b>Деградация дизельного топлива <i>Rhodococcus erythropolis</i> Ac-858 T</b> Костина Е.Г., Атыкян Н.А., Ревин В.В.	51
П-35	<b>Определение пуриновых 5'-нуклеотидов рибозного ряда методом планарной хроматографии</b> Красиков В.Д., Малахова И.И., Тяглов Б.В., Лобанов К.В., Прошкин С.А., Королькова Н.В., Миронов А.С.	52
П-36	<b>Бактериальные антагонисты микроводорослей</b> Кузнецова Н.И., Азизбемян Р.Р.	53
П-37	<b>Изучение <i>rfI</i>-гена бактерий <i>Pseudomonas putida</i> КМБУ 4308</b> Кулешова Ю.М., Максимова Н.П.	54
П-38	<b>Получение гибридных и модифицированных форм промоторов вирусов мозаики георгина и кольцевой гравировки гвоздики</b> Кулуев Б.Р., Ильясова А.А., Лебедев Я.П.	55
П-39	<b>Регуляция генов, кодирующих белки семейства RhtB</b> Кутукова Е.А., Закатаева Н.П., Лившиц В.А.	56
П-40	<b>Микробный препарат для повышения продуктивности люцерны посевной</b> Ланцевич А.А., Алещенкова З.М.	57
П-41	<b>Новый тип дрожжевой двугибридной системы, сигнал белкового взаимодействия в которой, основан на формировании прионовых агрегатов</b> Левитин Е.И.	58
П-42	<b>Культивирование <i>pseudomonas auerofaciens</i> на жидкой фракции после спиртовой барды</b> Лукаткин А.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В.	59
П-43	<b>3-D моделирование агробактериального белка VirE2, участвующего в переносе T-ДНК</b> Мазиллов С.И., Чумаков М.И.	60
П-44	<b>Значение сигнальных пептидов для транспорта в периплазматическое пространство <i>E.coli</i> рекомбинантных энтеротоксинов из <i>Staphylococcus aureus</i></b> Манувера В.А., Вейко В.П.	61
П-45	<b>Определение и анализ новых геномов термофильных архей</b> Марданов А.В., Равин Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Скрыбин К.Г.	62
П-46	<b>Эволюция генно-инженерного инструментария для конструирования бесплазмидных безмаркерных рекомбинантных штаммов <i>E. coli</i></b> Минаева Н.И., Гак Е.Р., Зименков Д.В., Скороходова А.Ю., Бирюкова И.В., Машко С.В.	63

П-47	<b>Экспрессия и характеристика рекомбинантных миниплазмидногена и микроплазмидногена человека</b> Минашкин М.М., Гурский Я.Г., Скрыпина Н.А., Бибилашвили Р.Ш.	64
П-48	<b>Модификация штамма <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, продуцирующего рекомбинантный сывороточный альбумин человека, путем гиперэкспрессии компонентов секреторного аппарата</b> Молчанова Д.В., Козлов Д.Г.	65
П-49	<b>Транскрипционная регуляция генов биосинтеза эктоина у галофильных метилотрофных бактерий</b> Мустахимов И.И., Решетников А.С., Хмеленина В.Н.	66
П-50	<b>Влияние микроорганизмов ризосферы на улучшение роста растений в условиях солевого стресса</b> Мухаметзянова А.Д., Schnell S., Шарипова М.Р., Каюмов А.Р.	67
П-51	<b>Изучение свойств фермента и структурной организации кластера нитриказы <i>alcaligenes denitrificans</i> c32</b> Новиков А.Д., Рябченко Л.Е., Леонова Т.Е., Залунин И.А., Ревина Л.П., Яненко А.С.	68
П-52	<b>Использования лакказы в катодном пространстве биотопливного элемента</b> Носова Н.М., Бут С.Ю.	69
П-53	<b>Исследование влияния ассоциации микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти и растений на эффективность очистки модельных систем, загрязненных нефтью</b> Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е.	70
П-54	<b>Клонирование и экспрессия генов куриного и свиного лейкоцитарного <math>\alpha</math>-интерферона в клетках бактерий <i>Escherichia coli</i></b> Потапович М.И., Трубицына М.В., Николайчик Е.А., Прокулевич В.А.	71
П-55	<b>Регуляция транскрипции рН-индуцируемого гена <i>ygjT</i> <i>Escherichia coli</i></b> Прошкин С.А., Чернятина А.А., Миронов А.С.	72
П-56	<b>Лактофаг БИМ БV-37 семейства <i>Podoviridae</i></b> Райский А.П., Белясова Н.А., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н.	73
П-57	<b>Синтез 4-гидроксиизолейцина на основе сопряжения ферментативных активностей альдолазы и аминотрансферазы: теоретические и практические аспекты</b> Рушкевич Н.Ю., Котлярова В.А., Самсонова Н.Н., Смирнов С.В.	74
П-58	<b>Детекция ряда карантинных фитопатогенов методом ПЦР в формате FLASH</b> Рязанцев Д.Ю., Абрамов Д.Д., Завриев С.К.	75
П-59	<b>Новые аспекты деградации салицилата у флуоресцирующих псевдомонад</b> Сазонова О.И., Измалкова Т.Ю., Кошелева И.А., Боронин А.М.	76
П-60	<b>Разработка научных основ для создания методов ремедиации загрязненных органофосфонатами почв с помощью микробных препаратов</b> Свиридов А.В., Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., Леонтьевский А.А.	77

П-61	<b>Влияние дрожжевого экстракта на метаболизм цитрата в <i>Lactococcus lactis</i></b> Серебренников В.М., Анорова Л.Н., Воронина Л.Н., Глазунов А.В.	78
П-62	<b>Селекция и изучение биологических свойств кислотоустойчивого штамма бифидобактерий</b> Сидоренко А.В., Новик Г.И.	79
П-63	<b>Плазмидная трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> с использованием их естественной компетентности</b> Сидорук К.В., Романенков Д.В.	80
П-64	<b>Анализ дифференциальной экспрессии генов в двух штаммах <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л., Свердлов Е.Д.	81
П-65	<b>Новые биотехнологические подходы к моделированию сложных фоточувствительных биосистем</b> Складнев Д.А.	82
П-66	<b>Получение чГ-КСФ в растворимой форме с использованием бактериального продуцента <i>E. coli</i></b> Скрыпник К.А., Косоруков В.С.	85
П-67	<b>Стресс-индуцированная модуляция NO-синтазной активности лактобацилл</b> Смоленцева О.А., Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н.	86
П-68	<b>Возможность использования перифитонных микроорганизмов для биоремедиации ПАУ-загрязненных вод</b> Тумайкина Ю.А.	87
П-69	<b>Новый способ получения мутантов <i>Pseudomonas aurantiaca</i> – продуцентов гиббереллинов</b> Феклистова И.Н., Скакун Т.Л., Максимова Н.П.	88
П-70	<b>Использование промоторов Pho-регулона для метаболически регулируемого биосинтеза L-фенилаланина (Phe) в <i>Escherichia coli</i></b> Цыренжапова И.С., Дорошенко В.Г., Айрих Л.Г., Казакова С.М., Машко С.В.	89
П-71	<b>Характеристика репликона рBS72 с увеличенным числом копий</b> Чалей В.А., Лагодич А.В., Карпиевич М.Н., Титок М.А.	90
П-72	<b>Получение мутантов <i>Bacillus subtilis</i>, зависимых по биотину</b> Чеписюк Н.В., Прокулевич В.А.	91
П-73	<b>Особенности регуляции биотинового оперона в клетках бактерий <i>Bacillus subtilis</i> и замена его природного промотора на конститутивный sрас-промотор</b> Чеписюк Н.В., Прокулевич В.А.	92
П-74	<b>Структура гена <i>speA</i>, супрессирующего патогенность <i>Erwinia carotovora</i>, и возможность альтернативной его трансляции</b> Чернышов С.В., Масулис И.С., Гороховатский А.Ю., Бурьянов Я.И.	93

П-75	<b>Взаимодействие пробиотиков с нормофлорой и патогенной микрофлорой при длительном совместном культивировании на плотных питательных средах</b> Чертович Н.Ф., Козловский Ю.Е., Хомякова Т.И., Степанов С.А., Козловская Г.В., Аренбаум Е.Л., Хомяков Ю.Н., Доброхотский О.Н.	94
П-76	<b>Способ получения микробного препарата для предпосевной инокуляции семян тритикале</b> Шестакова Е.А., Алещенкова З.М.	95
П-77	<b>Экспрессия фитазы <i>Obesumbacterium proteus</i> B-6897 в дрожжах <i>Yarrowia lipolytica</i></b> Эпова Е.Ю., Выборная Т.В., Соболевская Т.И., Лаптев И.А., Синеокий С.П.	96

## Работы молодых учёных и преподавателей

К-1	<b>Создание генетической конструкции pCMV-ETA-EGFP и эффекты её экспрессии в опухолевых клетках человека линии HeLa</b> Андрющенко А.С., Глинка Е.М.	99
К-2	<b>Метилотрофные дрожжи как основа биосенсора для детекции низших алифатических спиртов</b> Антонова О.Ю., Кувичкина Т.Н., Ашин В.В., Решетиллов А.Н.	101
К-3	<b>Микроорганизмы <i>G. oxydans</i> и <i>P. angusta</i> как основа низкоселективных биорецепторов многоканального биосенсора для контроля содержания компонентов в бродильных производствах</b> Арляпов В.А.	103
К-4	<b><i>Yarrowia lipolytica</i> – продуцент лактатоксидазы</b> Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г.	105
К-5	<b>Биотехнологическое получение L(+)-молочной кислоты</b> Бобкова М.Д., Сингирцев И.Н.	107
К-6	<b>Выделение токсинсвязывающего белка из кишечного эпителия личинок мучного хрущака <i>Tenebrio molitor</i></b> Булушова Н.В., Залунин И.А.	109
К-7	<b>Разработка методов получения антимикробных пептидов</b> Василевский А.А., Гришин Е.В.	112
К-8	<b>Продукция нефтеокисляющими бактериями индолилуксусной кислоты и биосурфактантов</b> Волченко Н.Н., Кочина О.В.	114
К-9	<b>Разработка молекул-носителей для целевых пептидов как основа создания новых безопасных вакцин и наработки терапевтических белков</b> Вячеславова А.О., Голденкова-Павлова И.В.	116

К-10	<b>Использование метода вычитающего рестрикционного фингерпринтинга для типирования штаммов чумного микроба</b> Гаева А.В., Булгакова Е.Г.	118
К-11	<b>Аборигенная микрофлора замазученных сточных вод в практике охраны водных экосистем от нефтяных углеводородов</b> Гальперина А.Р., Сопрунова О.Б.	120
К-12	<b>Выделение и изучение <i>Desulfosporosinus</i> sp. DB - перспективного для биогеотехнологии осаждения металлов</b> Герасимчук А.Л., Буторова О.П., Тихонова З.Л., Стыкон Г.А., Яненко А.С., Карначук О.В.	122
К-13	<b>Роль микробных аутоиндукторов анабиоза в регуляции экспрессии стрессовых регулонов</b> Голод Н.А., Лойко Н.Г., Эль-Регистан Г.И.	124
К-14	<b>Встречаемость генов факторов патогенности среди штаммов <i>Staphylococcus aureus</i>, выделенных у ВИЧ-инфицированных</b> Гончаров А.Е.	126
К-15	<b>Характеристика белков S-слоя <i>Bacillus anthracis</i> – перспективных компонентов химических сибиреязвенных вакцин</b> Гончарова А.Ю., Микшис Н.И., Попов Ю.А.	128
К-16	<b>Регуляция экспрессии генов межклеточной коммуникации бактерий метаболитами растений</b> Горшков В.Ю., Петрова О.Е., Мухаметшина Н.Е., Гоголев Ю.В.	130
К-17	<b>Сверхэкспрессия генов холерного токсина, связанная с изменением генома профага СТХφ <i>Vibrio cholerae</i></b> Горяев А.А.	132
К-18	<b>Характеристика области репликации плазмиды рАН36-4СРА штамма <i>Citrobacter hydrophyla</i> IBRV-36 4СРА</b> Жарикова Н.В., Маркушева Т.В., Кузнецов Б.Б.	134
К-19	<b>Функциональный анализ генов, контролирующих транспорт цинка у цианобактерии <i>Synechocystis</i> PCC 6803</b> Женавчук О.Ф., Коробан Н.В.	136
К-20	<b>Макет бисенсора проточно-инжекционного типа на основе иммобилизованной алкогольоксидазы для экспресс - определения спиртов</b> Зайцев М.Г.	138
К-21	<b>Фенотипическая изменчивость бактерий как фактор регуляции биотехнологических процессов</b> Клюянова М.А., Сопрунова О.Б.	140
К-22	<b>Повышение термостабильности люциферазы светляков <i>Luciola mingrelica</i> с помощью направленной эволюции <i>in vivo</i></b> Кокшаров М.И., Угарова Н.Н.	142
К-23	<b>Многоцелевой устойчивый биокатализатор на основе иммобилизованных клеток актинобактерий рода <i>Rhodococcus</i></b> Криворучко А.В.	144

К-24	<b>Анализ экологического разнообразия штаммов <i>Legionella pneumophilla</i> посредством молекулярно-генетического типирования бактерий</b> Кунда М.С., Воронина О.Л.	146
К-25	<b>Разработка высокопроизводительного роботизированного скрининга для направленной эволюции <math>\alpha</math>-амилазы <i>Bacillus amyloliquefaciens</i></b> Лавров К.В., Яненко А.С.	149
К-26	<b>Роль сенсорных РНК в регуляции клеточного метаболизма</b> Лобанов К.В., Миронов А.С.	151
К-27	<b>Использование комбинированных видов мутагенеза для получения мутантов дрожжей - продуцентов лимонной кислоты</b> Лунина Ю.Н., Пунтус И.Ф., Камзолова С.В., Моргунов И.Г.	153
К-28	<b>Поиск грибов – продуцентов L-лизин-<math>\alpha</math>-оксидазы</b> Макрушин К.В., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.	156
К-29	<b>Анализ генома диплоидных и гаплоидных форм кукурузы на наличие маркерных генов после агробактериальной трансформации генеративных клеток кукурузы</b> Мамонтова Е.М., Великов В.А., Волохина И.В., Чумаков М.И.	158
К-30	<b>L-аланоил-D-глутаматпептидаза бактериофага T5 как потенциальное антибактериальное средство</b> Микулинская Г.В., Одинокова И.В., Лысанская В.Я., Зимин А.А., Феофанов С.А., Степная О.А.	160
К-31	<b>Генетическая классификация гликозил-гидролаз семейства GN31</b> Наумов Д.Г.	162
К-32	<b>Изменение региоспецифичности 9-липоксигеназы кукурузы при сайт-направленном мутагенезе</b> Осипова Е.В., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.	164
К-33	<b>Биосенсорные системы на основе бактерий-деструкторов капролактама</b> Россинская И.В.	166
К-34	<b>Оптимизация составов жидких питательных сред для наработки биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов</b> Самков А.А., Карасева Э.В.	168
К-35	<b>Состав углеводородокисляющих микробных сообществ воды и донных отложений Азовского моря и Приазовских лиманов в районе предполагаемых нефтеразработок</b> Самкова С.М., Гора В.В.	170
К-36	<i>Использование схемы двухлокусного типирования для идентификации штаммов бифидобактерий, изолированных у детей раннего возраста</i> Субботина М.Е., Кунда М.С., Воронина О.Л.	172
К-37	<b>Изучение антибиотикоустойчивых клонов штамма <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>, продуцента альфа-амилазы</b> Токмакова И.П., Герасимова Т.В., Яненко А.С.	174

К-38	<b>Изменение каталитических свойств LeAOS3 томата (<i>Lycopersicon esculentum</i>) в результате замены отдельных аминокислот</b> Топоркова Я.Ю., Гречкин А.Н.	176
К-39	<b>Синтез лимонной кислоты дрожжами <i>Yarrowia lipolytica</i> при росте на отходах биодизеля</b> Фатыхова А.Р., Моргунов И.Г.	178
К-40	<b>Характеристика нового биолюминесцентного штамма рода <i>Vibrio</i></b> Хрульнова С.А., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б.	180
К-41	<b>Эффективность медиаторов электронного транспорта биоэлектрокаталитического окисления этанола бактериями <i>Gluconobacter oxydans</i> в биосенсорах и биотопливных элементах</b> Чигринова Е.Ю.	182
К-42	<b>Скрининг дрожжевых организмов-продуцентов янтарной кислоты</b> Юсупова А.И., Камзолова С.В.	184
К-43	<b>Наномодификация клеточной поверхности пробиотических лактобактерий как основа повышения их адгезивных свойств: роль оксида азота</b> Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н.	186

# **УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ**

## Активный транспорт метаболитов из клеток бактерий: физиологическая роль и практическое применение

Лившиц В. А., Закатаева Н.П.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»), 117545, Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д. 1, [vitaliy\\_livshits@agri.ru](mailto:vitaliy_livshits@agri.ru)

В связи с получением и исследованием штаммов *Escherichia coli*, продуцирующих L-треонин, нами были идентифицированы гены, кодирующие мембранные белки, участвующие в экскреции этой аминокислоты. Это гены *rhtA*, *rhtB* и *rhtC*. Сверхэкспрессия этих генов повышает устойчивость бактерий к высоким концентрациям аминокислот и их структурных аналогов. На этом основании разработан универсальный метод поиска генов, кодирующих белки-экспортёры соответствующих метаболитов.

Белки RhtA, RhtB и RhtC, кодируемые соответствующими генами, относятся к двум обширным семействам транспортных белков RhtB и DMT (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>). Следует отметить, что семейство белков RhtB было впервые идентифицировано, а ряд генов *E. coli*, кодирующих белки этого семейства, были подробно изучены в нашей лаборатории.

Проведенные исследования показали, что белки-экспортёры аминокислот во многом напоминают транспортёры множественной лекарственной устойчивости. Это относится к широкой специфичности некоторых из них, а также к характеру регуляции их экспрессии, которая может контролироваться как локальными репрессорами и активаторами, так и глобальными регуляторами. Характер регуляции определяется тем, какую физиологическую роль играет экспорт конкретного метаболита. Активное выведение вещества из клетки, очевидно, обеспечивает клеточный гомеостазис в условиях избыточного синтеза или ограниченного катаболизма соответствующего соединения, а также её адаптацию к различным стрессам. Кроме того, экскреция метаболитов необходима для обеспечения межклеточного взаимодействия в микробной популяции.

Повышение экспортной активности клеток в отношении того или другого метаболита значительно увеличивает продуктивность соответствующих штаммов-продуцентов. Это достигается путем повышения уровня экспрессии соответствующего гена (генов). В некоторых случаях активация экскреции должна осуществляться уже на ранних этапах метаболической инженерии продуцента, без чего дальнейшее его совершенствование просто невозможно.

Целенаправленный поиск генов *E. coli*, участвующих в экскреции ароматических аминокислот, привел к обнаружению гомологов RhtA, YddG и YedA, участвующих в экспорте фенилаланина и триптофана. На этой основе могут быть значительно улучшены технологические характеристики продуцентов этих аминокислот.

Поиск генов, участвующих в экскреции пуриновых производных, впервые привел к обнаружению у *E. coli* и у *Bacillus* транспортёров нуклеозидов, что открывает новые перспективы для совершенствования промышленных штаммов-продуцентов этих соединений. В настоящее время осуществляется дальнейшее исследование роли экспорта нуклеозидов в физиологии клетки.

Таким образом, в процессе генетико-селекционной работы по созданию штаммов-продуцентов получены результаты, имеющие не только прикладное, но и общебиологическое значение.

## Эволюционная генетика и таксономия дрожжевых организмов

Наумов Г.И.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд., д. 1;  
e-mail: [gnaumov@yahoo.com](mailto:gnaumov@yahoo.com)

Обобщено более, чем сорокалетнее генетическое изучение биоразнообразия различных аскомицетных родов дрожжей: *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Arthroascus*, *Williopsis*, *Zygowilliopsis*, *Galactomyces*, *Lachanceae* и *Eremothecium*. Полученные результаты позволили впервые сформулировать концепции биологических видов, географических и экологических популяций дрожжей. Генетические и молекулярные подходы позволили нам открыть новые виды и разновидности дрожжей, имеющие большое значение для науки и практики: *Saccharomyces* (*S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*), хищные дрожжи *Arthroascus* (*A. babjeviae*, *A. fermentans* var. *arxii*). Кроме того, были восстановлены некоторые забытые таксоны: *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *A. schoenii*, *K. lactis* var. *krassilnikovii*. Биологические виды одного рода легко скрещиваются друг с другом, но их гибриды стерильны – неспособны образовывать жизнеспособные аскоспоры. Географические популяции – виды *in statu nascendi*. С помощью генетической гибридизации, ПЦР и аллозимного анализов были обнаружены несколько географических популяций у видов *S. paradoxus*, *A. schoenii*, *K. lactis* и *K. dobzhanskii*.

Разработаны также генетические основы классификации родов и семейств дрожжей. Генетические роды дрожжей отражают эволюционное родство входящих в них видов с общей системой типов спаривания. Выявлен многообещающий тест на принадлежность дрожжей к одному и тому же семейству: положительная феромонная реакция между различными генетическими родами. В этой связи, мы считаем, что семейство *Saccharomycetaceae* гетерогенно.

В естественных популяциях винных дрожжей и среди коммерческих штаммов нами обнаружены межвидовые, очевидно, гетерозисные гибриды *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* x *S. bayanus* x *S. kudriavzevii*.

Природное разнообразие дрожжей – неисчерпаемый генофонд для фундаментальных и прикладных исследований.

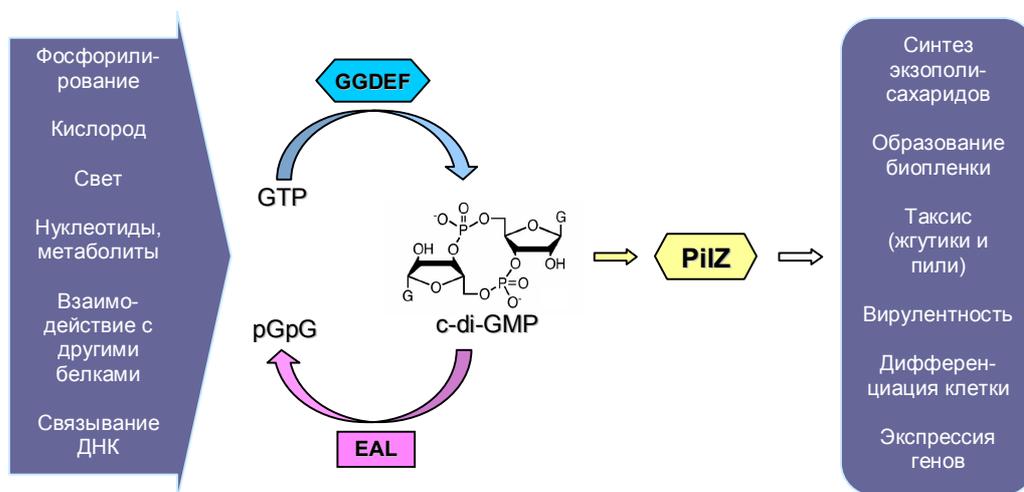
## C-di-GMP - глобальная сигнальная молекула, регулирующая биопленки и вирулентность бактерий

Рыженков Д.А., Шмидт Э., Тарутин М., Москвин О.В., Гомельский М.

Университет штата Вайоминг, факультет молекулярной биологии, 1000 E University Ave, Laramie, WY 82071, USA. e-mail: [gomelsky@uwyo.edu](mailto:gomelsky@uwyo.edu)

Прогресс в области молекулярной геномики в последние годы, а также повышенный интерес к поведению микроорганизмов на мультиклеточном уровне привели к открытию новой сигнальной молекулы, циклического дигуанилата или c-di-GMP. Многочисленные исследования привели к осознанию c-di-GMP, как глобального регулятора многих физиологических процессов в подавляющем большинстве изучаемых бактерий. c-di-GMP является центральным звеном в новой регуляторной сети, которая обеспечивает дифференциацию клетки и переключение между плавающим, подвижным образом жизни бактерий и прикрепленным к поверхности, неподвижным состоянием. Среди клеточных процессов, контролируемых c-di-GMP, найдены также синтез экзополисахаридов, образование биопленки, экспрессия факторов вирулентности и регуляция экспрессии генов. В лаборатории были открыты и изучены биохимические свойства белковых доменов, GGDEF и EAL, которые входят в состав ферментов, отвечающих за изменение концентрации c-di-GMP. В частности, было показано, что домен GGDEF обладает дигуанилатциклазной активностью, осуществляя синтез c-di-GMP. Также было продемонстрировано, что домен EAL обладает специфической фосфодиэстеразной активностью, гидролизуя c-di-GMP до линейного продукта, pGpG. Рассмотрены возможности функционирования ферментов, содержащих два домена, GGDEF и EAL. Было получено экспериментальное подтверждение тому, что белковый домен PilZ является специфическим рецептором c-di-GMP.

Таким образом, были исследованы основные белки, осуществляющие синтез, гидролиз и связывание c-di-GMP в бактериях. Тем не менее, большинство функций c-di-GMP и механизм действия остаются по большей части неизученными и требуют дальнейших исследований. Работы в данной области представляют собой огромный интерес для микробиологии, биотехнологии и медицины.



## **Экспрессия белков в метилотрофных дрожжах – экономичный путь производства лекарств нового поколения, ферментов и диагностических средств**

Толсторуков И.И.

*Keck Graduate Institute, Claremont, CA, USA; Biogrammatix Inc., Carlsbad, CA, USA*  
e-mail: [ilya\\_tol@kgi.edu](mailto:ilya_tol@kgi.edu); [ilya.tolstorukov@biogrammatix.com](mailto:ilya.tolstorukov@biogrammatix.com)

Метилотрофные дрожжи, в частности *Pichia pastoris*, в последние годы превратились в мощную систему для производства самых разнообразных белков и пептидов с успехом используемых в медицине и ветеринарии, в кормах животных, при переработке продуктов питания, в химических технологиях. В ряде стран налажены масштабные процессы по получению рекомбинантных инсулина, альбумина, коллагена и других белков человека с использованием дрожжей *Pichia pastoris* в качестве продуцента; с успехом проходят клинические испытания большой группы лекарств, в основе которых лежат экспрессируемые в *Pichia pastoris* рекомбинантные белки.

Основные факторы, лежащие в основе успеха при использовании экспрессионной системы метилотрофных дрожжей – простота, скорость и эффективность. Разработанные экспрессионные платформы и технологии позволяют создать дрожжевой продуцент и получить необходимые для испытаний количества очищенного белка в течение нескольких недель с момента инициации проекта. Эффективная секреторная система сопряженная с правильной сборкой и посттрансляционными модификациями создает предпосылки для простой очистки с получением химически и биологически активного продукта. Использование различных генетически модифицированных реципиентных штаммов *Pichia pastoris* позволяет не только увеличить продуктивность экспрессии, но также предопределяет получение белков, не воспринимаемых иммунной системой как чужеродные.

Будет рассмотрен ряд примеров получения продуцентов белков на основе усовершенствованной экспрессионной платформы *Pichia pastoris*, разработанной в Biogrammatix, Inc.

# **Постерные сообщения**

## Сравнительный анализ плазмид штаммов – деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот родов *Pseudomonas* и *Serratia*

Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В.

Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, РБ, Уфа, проспект Октября, д.69. e-mail: [tymark@anrb.ru](mailto:tymark@anrb.ru)

Изучение генофонда микроорганизмов современных техногенных экосистем представляет значительный интерес в связи с возможностью использования генетических элементов таких микроорганизмов в «белых» нанобиотехнологиях, направленных на защиту окружающей среды.

Цель настоящей работы – получение и сравнительный анализ экстрахромосомных элементов штаммов родов *Pseudomonas* и *Serratia*, выделенных из образцов почвенных популяций микроорганизмов современной промышленной экосистемы

В качестве объектов исследования были использованы штаммы *Pseudomonas fluorescens* 33F, *Pseudomonas putida* 19S, *Pseudomonas aeruginosa* 36 DHF, *Pseudomonas fluorescens* 39D, *Serratia marcescens* 22S. Идентификация культур была проведена согласно результатов секвенирования и сравнительного анализа последовательности генов 16S рНК.

В модельных экспериментах было установлено, что штаммы являются деструкторами хлорфеноксиуксусных кислот и выявлена динамика конверсии ксенобиотиков.

Произведен подбор методик выделения экстрахромосомных элементов штаммов. Установлено, что все штаммы обладают плазмидами. Сравнительный анализ плазмидных систем бактерий показал, что плазмиды различаются по размерам, которые варьируют в пределах 20-30 kb. Плазмиды имеют *Bam*HI-, *Hind*III- и *Pst*I- сайты рестрикции.

С использованием методов элиминации экстрахромосомных элементов обнаружено, что на плазмидах расположены генетические системы контроля катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот: ХФУК (хлорфеноксиуксусной), 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусной), 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксиуксусной) кислот. Также выявлено, что на исследованных плазмидах, помимо генов катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот, располагаются детерминанты резистентности к антибиотикам и солям тяжелых металлов.

Работа выполнена в рамках гранта Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

## **Влияние факторов транскрипции TnrA и CodY на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *B. intermedius* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis***

Ахметова А.И., Каюмов А.Р., Шарипова М.Р.

Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова – Ленина,  
биолого-почвенный факультет; 420008 Россия, г.Казань, Кремлевская, 18  
e-mail: [akhmetova1987@rambler.ru](mailto:akhmetova1987@rambler.ru)

В ответ на неблагоприятные условия окружающей среды у бактерий выработались механизмы, позволяющие координировать метаболизм в зависимости от доступности и разнообразия питательных веществ. В общем пуле протеиназ, секретлируемых бациллами, а именно *B. intermedius*, 10% принадлежит глутамилэндопептидазе, ферменту, осуществляющему гидролиз пептидов строго специфично по глутаминовой и аспарагиновой кислотам. Назначение данного фермента в настоящее время вызывает бурную дискуссию в научном обществе, и доминирующий механизм контроля экспрессии гена фермента остается неизвестным.

Целью данной работы было установить влияют ли факторы транскрипции TnrA и CodY на биосинтез глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*.

Анализ регулирующей области фермента позволил выявить потенциальный сайт взаимодействия с фактором транскрипции CodY с гомологией 73% к предполагаемой консенсусной последовательности, что позволяет предположить участие белка CodY в регуляции экспрессии гена протеиназы. Сайтов взаимодействия с фактором транскрипции TnrA не идентифицировано.

Штамм *B. subtilis*, дефектный по генам *tnrA* и *codY*, был трансформирован плазмидой pΔ58.21, несущей ген фермента, которая была любезно предоставлена профессором С.В.Костровым (ИМГ РАН, Москва). Изучение динамики роста культуры и накопления фермента показало, что в рекомбинантном штамме *B. subtilis*, дефектном по белку CodY, при росте на богатой среде продуктивность глутамилэндопептидазы увеличилась по сравнению с контрольным штаммом *B. subtilis* 168 в вегетативной фазе роста. В рекомбинантном штамме *B. subtilis*, дефектном по белку TnrA, биосинтез глутамилэндопептидазы контрольным и мутантными штаммами не отличался. Видимо, при росте на богатой среде фактор транскрипции TnrA не оказывает влияния на продуктивность фермента. На синтетической среде, где источником азота служит аммоний (2 мМ), экспрессия гена протеазы рекомбинантными штаммами резко снижалась как в контрольном так и в мутантных штаммах, на богатой азотом среде уровень биосинтеза фермента не отличался. Таким образом, фактор транскрипции TnrA не участвует в контроле экспрессии гена глутамилэндопептидазы.

На синтетической среде содержащей 20 мМ NH<sub>4</sub> уровень экспрессии гена протеиназы в рекомбинантном штамме *B. subtilis*, дефектном по белку CodY, не отличался от контрольного в вегетативной фазе роста.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что биосинтез глутамилэндопептидазы *B. intermedius* вероятно в ранней стационарной фазе негативно регулируется фактором транскрипции CodY

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-00789-а.

## Участие адаптивного мутагенеза в появлении устойчивых к рифампицину мутантов у *Salmonella typhimurium*

Бабынин Э.В., Ушакова Л.С.

*Казанский государственный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18,  
e-mail: [Edward.Babynin@ksu.ru](mailto:Edward.Babynin@ksu.ru)*

Развитие устойчивости к антибиотикам у бактерий является удобной моделью для изучения эволюционных процессов в популяции. Высокая скорость размножения и возможность контролировать условия инкубации, позволяют детально анализировать роль различных факторов, участвующих в адапционных процессах. Открытие «адаптивного мутагенеза» показало, что мутационный процесс является ответом организма на неблагоприятные условия. На примере мутаций устойчивости к рифампицину ( $Rif^R$ ) у штамма BA13 *Salmonella typhimurium* мы исследовали возможность участия в этом процессе адаптивного мутагенеза.

Природу возникновения  $Rif^R$ -мутантов определяли с помощью флуктуационного теста. Было установлено, что распределение  $Rif^R$ -мутантов носит смешанный характер: мутанты возникают как до контакта с рифампицином, так и после. Распределение и частота мутантов в независимых культурах менялись в ходе инкубации. В конце стационарной фазы (4 сутки) частота  $Rif^R$ -мутантов снижалась, а распределение приобретало чисто адаптивный характер. Нами также показано, что среди высоко-устойчивых мутантов преадаптивные  $Rif^R$ -мутанты встречаются реже. Это может быть связано с тем, что мутанты, несущие мутацию в гене *groV*, обеспечивающую устойчивость к рифампицину, имеют более низкую селективную ценность по сравнению с исходной культурой. Для проверки данной гипотезы мы создавали смешанную популяцию из  $Rif^R$ -мутантов и  $Rif^S$ -клеток, где пропорция мутантов составляла  $10^{-3}$ . В течение стадии логарифмического роста частота  $Rif^R$ -мутантов снижалась в 20-50 раз, что подтверждает гипотезу о низкой селективной ценности устойчивых к рифампицину клеток. Однако ситуация менялась в конце стационарной фазы: частота мутантов в популяции возрастала в 2-5 раз. Накопление  $Rif^R$ -мутантов на этапе, когда клетки уже не делятся, может быть связано с большей устойчивостью *groV*-мутантов к условиям голодания, которое наступает в периодической культуре. Различие в динамике  $Rif^R$ -мутантов в чистой  $Rif^S$ -культуре и в смешанной популяции также подтверждает участие адаптивного мутагенеза в возникновении рифампицин-устойчивых мутантов.

## **Выявление лучших форм селективного агента для проведения селекции пшеницы к грибному патогену в условиях *in vitro* (*Triticum aestivum* L.)**

Беккужина С.С.

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина. Республика Казахстан  
010011 г.Астана, пр. Победы, 62.  
тел. (7172) 396167, e-mail: [sara-bek@yandex.ru](mailto:sara-bek@yandex.ru)

Септориальная инфекция является острой проблемой мирового масштаба и об этом свидетельствуют материалы международного симпозиума: «*Septoria* и *Stagonospora* – болезни злаков». На данном форуме ученых и практиков детально обсуждаются традиционные и нетрадиционные подходы борьбы с болезнью, механизмы ответной реакции, распространение септориальных болезней и о наносимом ущербе на продуктивность хлебных культур на мировом уровне (Tunis, 2003).

Данную проблему трудно решить, используя отдельно традиционные способы защиты растений и посевов. При отборе форм устойчивых к грибному патогену на наш взгляд более эффективным является мультидисциплинарный подход.

В ранних исследованиях для индукции клеточных колоний яровой мягкой пшеницы устойчивых к экзометаболизму фитопатогенного гриба использовали культуральный фильтрат и фитотоксины гриба *Septoria nodorum* B.

В данной серии экспериментов модифицирована методика по выделению грибного фильтрата для получения новой формы селективного агента (совместное культивирование гриба и растений). Через 10,20,30 дней культивирования гриба *Septoria nodorum* выделен водный фильтрат. Проведён подбор концентрации водного фильтрата для изучения токсического действия при прорастании семян и действие фильтрата на пролиферацию клеточных колоний при добавлении в питательную среду. Изучение токсичности водного фильтрата на уровне зрелых зародышей при прорастании семян показало, что рост корней и проростков на 3-день культивирования сильно угнетается при 30 % концентрации водного фильтрата по сравнению с 50% культуральным фильтратом, полученным из чистой культуры гриба. Выявлено, что водный фильтрат гриба является более токсичным, чем культуральный фильтрат фитопатогенного гриба *S. nodorum*.

При добавлении водного фильтрата в питательную среду в качестве селективного фактора в концентрации 10,20,30 % прирост каллусной ткани после первого пассажа снижается. Прирост каллусных клеток на 30% концентрации фильтрата после второго пассажа приводит к отрицательным результатам.

Таким образом, результаты полученных данных демонстрируют, что активность действия экзометаболизмов водного фильтрата гриба *Septoria nodorum* на клеточном уровне, и активность его действия на уровне целого растения является одинаково высокотоксичным.

## Роль некоторых глобальных регуляторов экспрессии генов в процессе образования биопленок и синтеза АИ-2 клетками *Escherichia coli*

Белик А.С.<sup>1</sup>, Завильгельский Г.Б.<sup>2</sup>, Хмель И.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, пл. Ак. Курчатова, 2; [khmel@img.ras.ru](mailto:khmel@img.ras.ru)

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИГенетика), 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.

Многие бактерии способны контролировать экспрессию определенных групп генов в ответ на повышение плотности их популяции. Такой тип регуляции получил название Quorum Sensing (QS). Системы QS включают два обязательных компонента: низкомолекулярные сигнальные молекулы - аутоиндукторы (АИ), и регуляторные белки, с которыми связываются АИ. В настоящее время охарактеризованы АИ, значительно различающиеся по химическому строению: АИ-1, АИ-2, АИ-3 и др.

АИ-2 был обнаружен впервые при изучении регуляции биолюминесценции у морской бактерии *Vibrio harveyi*. АИ-2 *V. harveyi* содержит атом бора и является фуранозил-борат диэфиром. Несколько отличается по химической структуре АИ-2 у *Salmonella typhimurium*, в частности, он не содержит атома бора. Эти АИ-2 и их предшественники находятся в природных условиях в равновесии и легко взаимопревращаются. Оба вида АИ-2 узнаются рецепторным белком штамма-биосенсора *V. harveyi* BV170. АИ-2 и его синтаза LuxS широко распространены у грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Quorum Sensing системы принимают участие в контроле процесса формирования биопленок. Более 99% бактерий существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных, прикрепленных к твердым поверхностям биопленок. Биопленки имеют характерную архитектуру, заключены в экзополимерный матрикс, содержащий наполненные жидкостью каналы, по которым осуществляется приток питательных веществ и кислорода и выведение конечных продуктов метаболизма бактериальных клеток. Способность бактерий существовать в составе биопленок представляет серьезную проблему для медицины, т.к. патогенные бактерии в биопленках значительно более устойчивы к действию антибактериальных препаратов (например, антибиотиков) и иммунной системы организма. Регуляция образования биопленок мало изучена.

В нашей работе показано, что мутация, инактивирующая ген сигмы S субъединицы РНК-полимеразы *rhoS*, резко снижает количество активного АИ-2 в культуральной жидкости. Мутации в гене *rhoN*, кодирующем сигма N субъединицу РНК-полимеразы, а также в гене *lon*, кодирующем Lon-протеиназу, напротив, увеличивают содержание активных АИ-2 и усиливают формирование биопленок. Мутантные штаммы, у которых отсутствуют гистонподобные белки H-NS или StrA, накапливают несколько большее количество АИ-2 и значительно хуже образуют биопленки, чем изогенный штамм дикого типа. В двойном мутанте, у которого отсутствуют оба эти белка, содержание АИ-2 в культуральной жидкости снижается, а формировать биопленки этот мутант практически не способен. Полученные результаты, вместе с имеющимися литературными данными, показывают, что сложные регуляторные сети, включающие ряд глобальных регуляторов транскрипции, участвуют в контроле образования биопленок и синтезе АИ-2 у *Escherichia coli*.

## Оценка $\beta$ -галактозидазной активности микроорганизмов, используемых при изготовлении ферментированных молочных продуктов

Богданова Л.Л.<sup>1</sup>, Сапунова Л.И.<sup>2</sup>, Василенко С.Л.<sup>1</sup>, Тамкович И.О.<sup>2</sup>, Дудко Н.В.<sup>1</sup>, Сафроненко Л.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 220075, г. Минск, пр. Партизанский, 172; e-mail: [bogdanova\\_ll@tut.by](mailto:bogdanova_ll@tut.by)

<sup>2</sup>ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. Купревича, 2; e-mail: [leonida@mbio.bas-net.by](mailto:leonida@mbio.bas-net.by)

В настоящее время широко изучается свойство микробных  $\beta$ -галактозидаз катализировать реакцию трансгликозилирования, востребованное при производстве олигосахаридов – селективных стимуляторов роста полезной кишечной микрофлоры человека и других млекопитающих. Концентраты пробиотических бактерий, содержащих синтезируемые с участием  $\beta$ -галактозидазы галактоолигосахариды, используются для производства диетических молочных продуктов питания и лечебно-профилактических препаратов, показанных при дисбактериозах.

Целью настоящего исследования явилась характеристика  $\beta$ -галактозидазной активности молочнокислых бактерий из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий РУП «Институт мясо-молочной промышленности» (г. Минск, Беларусь).

С использованием типовых штаммов молочнокислых бактерий проведено сравнение наиболее распространенных методов первичного скрининга микроорганизмов, продуцирующих вне- и внутриклеточные  $\beta$ -галактозидазы. В качестве наиболее чувствительного выбран чашечный метод отбора, предусматривающий включение в состав дифференцирующей среды хромогенного субстрата – 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактозида. При росте на указанной среде колонии синтезирующих  $\beta$ -галактозидазу бактерий приобретали голубую окраску, интенсивность которой определялась количеством продуцируемого ими ферментного белка. Указанным методом проанализирована  $\beta$ -галактозидазная активность 142 штаммов молочнокислых бактерий.

Согласно полученным данным, ни один из 52 исследованных штаммов бактерий рода *Lactococcus*, поровну представленных подвидами *L.lactis* ssp. *lactis* и *L.lactis* ssp. *diacetylactis*, не синтезировал  $\beta$ -галактозидазу. В то же время, невысоким уровнем активности характеризовались все изученные представители рр. *Bifidobacterium* (14 штаммов) и *Propionibacterium* (4 штамма).

Существенные различия по уровню продукции  $\beta$ -галактозидазы обнаружены между изученными 72 штаммами бактерий рода *Lactobacillus*. Среди мезофильных культур доля не проявляющих ферментативную активность штаммов составила 2,4%, характеризующихся низким ее уровнем – 71,4%, высоким – 26,2%. В то же время среди термофильных представителей этой группы бактерий преобладали штаммы со средней или высокой (соответственно 53,5% и 35,7%)  $\beta$ -галактозидазной активностью, и только у 10,7% из них фермент не обнаруживался.

Культуры молочнокислых бактерий, которые при росте на агаризованных средах отличались максимальной  $\beta$ -галактозидазной активностью, отобраны для дальнейших исследований.

## Биокаталитический синтез диаденозин-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфата

Бурко Д.В., Квач С.В., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича, 2.

e-mail: [dinaburko@mail.ru](mailto:dinaburko@mail.ru)

Диаденозин-5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфат (Ap<sub>4</sub>A) состоит из двух остатков аденозина, соединенных тетрафосфатной цепочкой посредством фосфоэфирных связей между их 5'-атомами рибозы. Ap<sub>4</sub>A присутствует внутри всех прокариотических и эукариотических клеток. В последнее время к этому динуклеотиду привлечено особое внимание, поскольку предполагается, что он является модулятором ответа клетки на стресс. Для синтеза Ap<sub>4</sub>A предложены многостадийные и довольно трудоемкие химические процессы. С другой стороны известно, что синтез Ap<sub>4</sub>A из АТФ может осуществляться с помощью аминокил-тРНК-синтетаз. Эти ферменты катализируют активацию аминокислот под действием АТФ с образованием аминокиладенилата и пирофосфата. Атака этого аминокиладенилата второй молекулой АТФ приводит к образованию Ap<sub>4</sub>A.

В настоящем исследовании в качестве биокатализаторов для синтеза Ap<sub>4</sub>A *in vitro* мы использовали рекомбинантные бактериальные аминокил-тРНК-синтетазы. Для этого нами с помощью ПЦР был выделен ген *Escherichia coli*, кодирующий термоиндуцибельную лизил-тРНК-синтетазу (LysU), и ген, кодирующий лизил-тРНК-синтетазу *Thermus thermophilus* (LysRS). Выделенные гены впервые были лигированы в вектор pRsetB таким образом, чтобы в рамку считывания гена был включен дополнительный полинуклеотид, содержащий 6 гистидиновых кодонов. Такая структура векторов позволяет существенно упростить процедуру очистки фермента с помощью металло-аффинной хроматографии (на никель-содержащих сорбентах). Лигирующие смеси были использованы для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). В типичных экспериментах трансформированные клетки экспрессировали LysU до уровня, составляющего не менее 30% от общего количества растворимых клеточных белков, а LysRS – не менее 20%. С помощью аффинной хроматографии были получены гомогенные препараты рекомбинантной LysU с 90% выходом и рекомбинантной LysRS с 85% выходом. Показана возможность применения полученных рекомбинантных лизил-тРНК-синтетаз для синтеза Ap<sub>4</sub>A. Максимальная степень конверсии АТФ в Ap<sub>4</sub>A при использовании в качестве биокатализатора LysU достигала 95% через 1 ч, а с LysRS – через 3 ч. Было установлено, что фермент LysU проявляет максимальную активность при температуре 40-45 °С, в буфере MOPS-KOH (20 мМ, рН 6-6,5) и только в присутствии ионов Zn<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (в концентрации 0,16 и 10 мМ, соответственно).

Разработан метод выделения Ap<sub>4</sub>A из реакционной смеси с выходом в расчете на исходный АТФ 80% от теоретически возможного.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрирована возможность применения рекомбинантной LysU для биотехнологического получения фармакологически важного Ap<sub>4</sub>A, изучены ее физико-химические свойства и разработан метод выделения продукта из реакционной смеси. Впервые установлено, что ген бактерии *Thermus thermophilus*, кодирующий лизил-тРНК-синтетазу, способен экспрессироваться в гетерологичной системе – клетках *Escherichia coli*, а продукт экспрессии гена может быть использован для синтеза Ap<sub>4</sub>A.

## Характеристика почвенных нафталинутилизирующих бактерий, выделенных на территории Беларуси

Василенко С.Л., Чернова А.И., Лагодич А.В., Титок М.А.

Белорусский государственный университет, биологический факультет,  
220030, Минск, Беларусь, Пр. Независимости, д. 4, e-mail: [titok@bsu.by](mailto:titok@bsu.by)

Весьма актуальным является изучение природных бактерий деструкторов, поскольку именно в естественных условиях возникают новые комбинации генов, детерминирующие биологически значимые признаки. Целью настоящего исследования являлась идентификация бактерий хозяев, установление локализации детерминант биодegradации, а также изучение организации генов с широкой (*nahAc* и *nahG*) у нафталинутилизирующих бактерий (103 штамма грамотрицательных и 9 штаммов грамположительных бактерий), выделенных из почв на территории Беларуси.

На основании физиолого-биохимического анализа, а также рестрикционного анализа продуктов амплификации генов 16S РНК грамотрицательные нафталинутилизирующие бактерии были идентифицированы как *P. fluorescens* (49 штаммов), *P. putida* (31 штамм) и *P. stutzeri* (1 штамм). Остальные выделенные бактерии (не синтезируют флюоресцирующий пигмент) были определены только до рода и отнесены к *P. species* V4 (5 штаммов) *P. species* V2 (13 штаммов) и *P. species* V3 (1 штамм). На основании частичного сиквенс-анализ генов 16S РНК грамположительные нафталинутилизирующие бактерии могут быть определены как *Bacillus sp.* (1 штамм), *P. naphthalenovorans* (4 штамма), *Rhodococcus sp.* (2 штамма), *Arthrobacter sp.* (2 штамма). Особый интерес представляет штамм *Bacillus sp.* AL18, способный помимо нафталина утилизировать толуол, фенантрен, антрацен, а также расти в присутствии нефти (2%) и ее производных (керосин, дизельное топливо, гексадекан).

На основании результатов ПЦР-анализа (использовали 3 пары праймеров, обеспечивающих амплификацию определенных фрагментов гер-областей плазмид IncP-9 и IncP-7) было установлено, что в клетках 74 штаммов грамотрицательных бактерий содержатся плазмиды, относящиеся к группе IncP-9 ( $\delta$ -,  $\zeta$ - и  $\iota$ -подгруппы) в клетках 4 штаммов присутствуют плазмиды группы IncP-7, 2 штамма обладают одновременно репликонами P-7 и P-9 групп несовместимости. У трех штаммов грамположительных бактерий зафиксирована спонтанная утрата признака утилизации нафталина, на основании чего можно предположить внехромосомную локализацию *nah*-детерминант.

Рестрикционный анализ продуктов амплификации генов *nahAc* и *nahG*, обеспечивающих синтез ключевых ферментов катаболизма нафталина, у изолированных грамотрицательных бактерий позволил помимо известных типов гена *nahAc* (AN10, C18 и A88) и гена *nahG* (NAH7, AN10, pDTG1 и KF715), впервые выявить полиморфизм в пределах типа C18 гена *nahAc* (обозначены как типы C18\_V1, C18\_V2 и C18\_V3), обнаружить новую, ранее не описанную последовательность гена *nahG* (обозначена как тип AL10), а для 35 штаммов установить сходство рестрикционных профилей ампликонов гена *nahG* с типом A88 в случае рестриктазы MspI и с типом NAH7 в случае рестриктазы RsaI (обозначены как тип A88-NAH7). В результате проведенного анализа было установлено, что природные репликоны содержат уникальные сочетания генов *nahAc* и *nahG*, что может свидетельствовать о сопряженном характере изменения нуклеотидных последовательностей данных генетических детерминант.

## **VIR-обусловленный перенос производных плазмиды RSF1010 между агробактериями и энтеробактериями**

Великов В.А.

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Саратовский государственный университет. 410049, г.Саратов, пр. Энтузиастов, д.13, e-mail: [v\\_velikov@mail.ru](mailto:v_velikov@mail.ru)*

Бактерии рода *Agrobacterium* обладают способностью передавать в геном растений небольшую часть своей ДНК (Т-ДНК), экспрессия которой вызывает у растений развитие опухолей - корончатых галлов. Перенос Т-ДНК в растения осуществляется по механизму, сходному с механизмом бактериальной конъюгации. Так, гены *vir*, контролирующие перенос Т-ДНК, проявляют выраженную гомологию нуклеотидных последовательностей с *tra*- и *trb*-генами, ответственными за конъюгацию у бактерий, а границы Т-ДНК являются структурно-функциональными аналогами *OriT*. В подтверждение конъюгативной модели транспорта Т-ДНК в растения свидетельствует потенциальная способность агробактерий переносить в растения природную мобилизуемую бактериальную плазмиду RSF1010; на основе этой плазмиды создан ряд векторов для трансформации растений. Также достаточно широко известны эксперименты по *vir*-обусловленному переносу плазмиды RSF1010 между клетками разных штаммов *Agrobacterium* при скрещиваниях.

В работе ставилась цель выяснить ограничена ли способность к *vir*-обусловленному транспорту плазмиды RSF1010 внутривидовым переносом или же RSF1010 может передаваться из клеток *Agrobacterium* в клетки различных бактерий, в том числе тех, которые не являются почвенными обитателями.

Проведенные эксперименты показали, что *vir*-гены агробактерий могут обеспечивать эффективный перенос производных плазмиды RSF1010 между клетками бактерий, не состоящих друг с другом в близком родстве. В частности выявлена принципиальная способность агробактериальных генов вирулентности детерминировать перенос производных плазмиды RSF1010 в клетки *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* и *Erwinia herbicola*. Перенос производных RSF1010 из клеток микроорганизма *A.tumefaciens*, относящегося к семейству *Rhizobiaceae*, в клетки трех приведенных представителей семейства *Enterobacteriaceae* происходит с эффективностью, сходной с внутривидовыми скрещиваниями. В среднем плазмиду получает одна из 10000 клеток кишечной палочки или эрвинии, находявшихся в конъюгационной смеси на поверхности агаризованной питательной среды на момент начала совместной инкубации с агробактериями.

Таким образом, некоторые искусственно созданные векторы для трансформации растений способны к эффективному распространению между разными бактериями с использованием двух разных систем, что необходимо учитывать при их использовании для трансформации растений.

Способность векторов на основе RSF1010 попадать в клетки различных неродственных агробактериям микроорганизмов, на наш взгляд серьезной опасности не представляет, поскольку для того, чтобы эти бактерии смогли трансформировать растения, необходимо присутствие плазмидных *vir*-генов и хромосомных *chv*-генов *Agrobacterium tumefaciens*, которые у энтеробактерий отсутствуют. В то же время эксперименты показывают, что агробактерии способны к эффективному обмену генетической информацией с другими организмами с использованием разнообразных путей.

## Селекция мутаций в гене *recA*, повышающих радиустойчивость *Escherichia coli*

Вербенко В.Н., Кузнецова Л.В., Крупьян Е.П., Суслов А.В., Шалгуев В.И.

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН  
188300, Ленинградская обл., г. Гатчина. e-mail: [verbenko@omrb.pnpi.spb.ru](mailto:verbenko@omrb.pnpi.spb.ru)

Для селекции мутаций в гене *recA*, дающих фенотип  $recA^{Hcr}$  (High capacity of reactivation), мы использовали метод обогащения радиустойчивыми клонами популяции клеток *E. coli*  $\Delta recA$ , трансформированных плазмидой pUC19-*recA*1.1, несущей ген  $recA^+$  дикого типа, и плазмидами pKS5 и pKS*rec*30 с клонированными аллелями гена *recA* *D. radiodurans*:  $recA^+$  и *recA*670, соответственно. Метод основан на повторяющихся циклах  $\square$ -облучения и направлен на выделение плазмид, доминантно повышающих резистентность клеток.

После 12 циклов  $\gamma$ -облучения, подращивания, выделения плазмиды и трансформации был выделен вариант плазмиды pUC19- $recA^{Hcr}$  с большим радиопротекторным эффектом по сравнению с исходной плазмидой pUC19- $recA^+$ . Плазмида pUC19- $recA^{Hcr}$ , несущая мутантный аллель  $recA^{oc}$  гена *recA* ключевого белка SOS-системы репарации и гомологичной рекомбинационной репарации, поднимает радиорезистентность клеток *E. coli*  $\Delta recA$  до уровня, превышающего устойчивость клеток дикого типа ( $recA^+$ ) в 1,5 раза. Радиозащитный эффект этой плазмиды значительно ослаблен в мутанте *lexA3 recA* $\Delta$ 21, дефектном по белку LexA и индукции SOS-регулона. Плазмида pUC19- $recA^{Hcr}$  ( $recA^{oc}$ ) эффективно супрессирует УФ-чувствительность мутанта  $\Delta recA$ . Мутация  $recA^{oc}$  приводит к конститутивному высокому уровню синтеза белка RecA. Секвенирование показало, что эта мутация (*recA*o20) затрагивает SOS-блок в операторе гена *recA* и повышает гетерологичность сайта связывания димера LexA.

Исходные плазмиды pKS5 и pKS*rec*30, несущие нативный и мутантный аллели гена *recA* *D. radiodurans* под контролем лактозного промотора, незначительно увеличивают радиорезистентность клеток *E. coli* с мутациями в генах *recA* и *ssb*. Белок RecA *D. radiodurans* экспрессируется в клетках *E. coli* и его синтез может быть дополнительно индуцирован. Радиозащитный эффект ксенологичного белка не превышает 1.5 раза и значительно уступает вкладу плазмиды pUC19-*recA*1.1, несущей ген  $recA^+$  *E. coli*, в восстановление устойчивости делеционного мутанта  $\Delta recA$ . После серии последовательных облучений возрастающими дозами  $\gamma$ -радиации клеток *E. coli*  $\Delta recA$ , несущих плазмиды с аллелями гена *recA* *D. radiodurans*, получены мутантные аллели *recA*-300 и *recA*30-300, способные эффективно взаимодействовать с системами репарации *E. coli*.

Полученные данные подтверждают то, что высокий уровень синтеза белка RecA *per se* недостаточен для экспрессии  $\gamma$ -индуцируемых функций и то, что для полной индукции SOS-системы репарации необходима дерепрессия других *lexA*-зависимых генов, кроме *recA*. Экспрессия гена *recA* *D. radiodurans* в клетках *E. coli* не приводит к комплементации мутаций в гене *recA* в хромосоме, возможно, из-за особенностей структуры и функционирования белка RecA *D. radiodurans*. Новые мутантные аллели *recA* *D. radiodurans* демонстрируют возможность селекции мутантных вариантов гена *recA* из *D. radiodurans*, повышающих радиустойчивость эволюционно отдаленных видов.

## **Исследование влияния ассоциации микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти на биометрические характеристики растений в модельных системах, загрязненных нефтью**

Ветрова А.А.<sup>1,2</sup>, Овчинникова А.А.<sup>1,2</sup>, Филонов А.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Пуцинский государственный университет*

<sup>2</sup> *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН*

*г. Пуцино, Московская Область, пр. Науки 5, 142290.*

*e-mail: [vetrova123@rambler.ru](mailto:vetrova123@rambler.ru)*

В конце XX и начале XXI столетий одной из важнейших экологических проблем России, как и всего мира, стало загрязнение окружающей среды органическими веществами, основными из которых являются нефтепродукты, негативно воздействующие на почвенный слой, поверхностные воды и геологическую среду, в том числе подземные воды. Микробная деградация нефтезагрязнений является существенным и наиболее важным компонентом биотехнологий очистки окружающей среды. Использование микроорганизмов для биоремедиации требует фундаментальных исследований механизмов процессов биodeградации, так же как путей увеличения скорости деструкции углеводов. Целью данной работы было исследование роли плазмидосодержащих микроорганизмов-нефтедеструкторов в процессе деградации нефти.

Имеются два подхода, основанные на использовании эндогенных или интродуцируемых микроорганизмов в местах загрязнения. Первый называется эндогенной биоремедиацией (*intrinsic bioremediation*) и предполагает активацию аборигенной микрофлоры, адаптированной к конкретным условиям данной загрязнённой территории. Второй подход основан на внесении активных микроорганизмов – деструкторов в виде биопрепарата в места загрязнения и называется биоулучшением (*bioaugmentation*).

Плазмиды играют важную роль в адаптации микроорганизмов к изменяющимся условиям окружающей среды. Эти генетические детерминанты позволяют содержащим их микроорганизмам катаболизировать необычные и устойчивые в окружающей среде соединения, такие, как ароматические углеводороды, которые неспособны разлагать большинство известных микроорганизмов. Горизонтальный перенос плазмид может ускорить появление новых катаболических путей, необходимых для разрушения нефти и нефтепродуктов. В загрязненных почвах сильное селективное давление благоприятствует конъюгационному переносу соответствующих плазмид. Возникновение в результате горизонтального переноса новых комбинаций «плазида – бактерия» может приводить к появлению более эффективных и конкурентоспособных штаммов-деструкторов, которые могут быть использованы для успешной биоремедиации загрязненных территорий. В результате проведённых нами модельных почвенных экспериментов установлено, что при интродукции плазмидосодержащих микроорганизмов и внесении минерального удобрения процесс биodeградации нефти ускорился в 2 – 3 раза.

## Экспресс-анализ гербиаса в культуральных жидкостях методом электроосмотической тонкослойной хроматографии

Воейкова Т.А.<sup>1</sup>, Антонова С.В.<sup>1</sup>, Тяглов Б.В.<sup>1</sup>, Барсуков Е.Д.<sup>1</sup>, Сизова И.А.<sup>2</sup>, Малахова И.И.<sup>3</sup>, Красиков В.Д.<sup>3</sup>

1. ФГУП ГосНИИгенетика, 117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, e-mail: [voeikova@genetika.ru](mailto:voeikova@genetika.ru)

2. Universitat Regensburg, Regensburg, Universitat Str. 32, D93040, Deutschland, e-mail: [irinasiz@yahoo.com](mailto:irinasiz@yahoo.com)

3. НТЦ "Ленхром", 199004, Россия, Санкт-Петербург, В.О., Большой просп. д. 31, e-mail: [lenchrom@hg.macro.ru](mailto:lenchrom@hg.macro.ru)

В последние годы проявился значительный интерес к антибиотику гербиасу (биалафосу) (штамм-продуцент *Streptomyces hygroscopicus*) как к гербициду. Биалафос [4-(гидроксиметилфосфоноил)-L-2-аминобутирил-L-аланил-L-аланин] обладает не только широким спектром гербицидной активности, но и со временем хорошо разрушается под действием ферментов, выделяемых почвенными микроорганизмами. Культуральные жидкости (КЖ) *Streptomyces hygroscopicus* помимо биалафоса содержат его предшественник – фосфинотрицин [L-2 - амино - (4-гидроксиметилфосфоноил) - масляная кислота], L-аланин, L-аланил-L-аланин, и неидентифицированные короткие пептиды. Ранее для определения биалафоса и фосфинотрицина на отечественных ВЭТСХ пластинках "Сорбфил" была разработана подвижная фаза: пропанол-2 – 25%-ный водный аммиак (7 + 3, v/v). Обнаруживающий реагент - нингидрин. Время разделения составляло 60-65 мин.

В настоящей работе для ускорения разделения биалафоса и присутствующих в КЖ компонентов использован метод электроосмотической тонкослойной хроматографии. Для проведения эксперимента была смонтирована установка, которая состояла из двух блоков: 1 – горизонтальной камеры, фирмы «Pharmacia» (Швеция), снабженная стеклянными кюветами для элюента, вместимостью 5.0 мл, и 2 – высоковольтного выпрямителя (0-25 kV, максимальная величина тока 1000  $\mu$ A), фирмы «Shandon» (Англия). Разделение проводили на отечественных ВЭТСХ пластинках "Сорбфил" ПТСХ-В-П (Россия). В качестве элюента использовали смесь: диметилсульфоксид – диметилформамид – триэтаноламин – вода (85 + 5 + 2 + 8, v/v). Разделение антибиотиков было проведено в течение 10.0 мин., при 4.0 kV и величине тока 600  $\mu$ A. В качестве обнаруживающего реагента использовали нингидриновый реактив в ацетоне. Нанесение обнаруживающего реагента проводили методом погружения, время экспозиции 25 сек. Цветную реакцию на хроматограмме проводили при 70<sup>0</sup>С в течение 10 мин., наблюдали желтые пятна на белом фоне. Пределы обнаружения биалафоса 0.5 и 0.1 мкг/пятно соответственно. Количественную обработку данных проводили на видеоденситометре «ДенСкан 04» (НТЦ «Ленхром», Россия). Время обработки одной хроматограммы 1.5 мин., (21 точка). Пределы количественного определения биалафоса и фосфинотрицина составляли 0.8 и 0.2 мкг/пятно соответственно. Область линейного сигнала денситометра для биалафоса 0.8 – 4.0 мкг/пятно, для фосфинотрицина 0.2 – 2.0 мкг/пятно. Относительная погрешность среднего измерения < 5.0, при n = 3, P = 0.95.

Работа была выполнена с помощью гранта РФФИ № 08-08-00710-А.

## Анализ генетических и физиолого-биохимических характеристик стрептомицетов в космическом полете на беспилотном аппарате «Фотон М-3»

Воейкова Т.А.<sup>1</sup>, Емельянова Л.К.<sup>1</sup>, Тяглов Б.В.<sup>1</sup>, Новикова Л.М.<sup>1</sup>, Goins T.L.<sup>2</sup>, Pyle B.H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГУП Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Россия, 117545, Москва, 1 Дорожный пр., 1. e-mail: [voeikova@genetika.ru](mailto:voeikova@genetika.ru)

<sup>2</sup>Department of Microbiology, 109 Lewis Hall, Montana State University, Bozeman, MT 59717, Montana, USA. e-mail: [barryp@montana.edu](mailto:barryp@montana.edu)

В 2007 г. на Российском космическом беспилотном аппарате «Фотон М-3» в 12-и суточном полете были проведены эксперименты со штаммами рода *Streptomyces*. Температура инкубации полетных образцов (F), синхронного (SC) и лабораторного (LC) контрольных образцов составляла 30°C. Штаммы культивировали на агаризованных средах в чашках Петри. Цель эксперимента - изучить влияние факторов космического полета (ФКП) на процессы дифференциации, образования биологически активных веществ, передачи хромосомной ДНК при скрещивании штаммов, стабильность наследования плазмиды.

При изучении процессов дифференциации и метаболизма у *Streptomyces lividans* было показано, что частота образования колоний с атипичной морфологией, уровень синтеза комплекса протеолитических ферментов и пигментов повышены в F образцах по сравнению с SC.

Анализ стабильности наследования в штамме *S. lividans* автономной мультикопийной плазмиды pIJ702, содержащей гены, ответственные за устойчивость к антибиотику тиострептон и синтез пигмента меланина, показал, что частота потери плазмиды в SC образцах больше (34-45%), чем в F и LC образцах (10-15% и 5-10%, соответственно).

Исследование процесса синтеза меланина у штамма *S. lividans* (pIJ702) показало снижение удельной продуктивности штамма в F образцах на 22%. При этом уровень накопления биомассы в F образцах повышен. Анализ фракционного состава меланина методом НРТЛС показал, что число, молекулярная масса и процентное содержание каждой фракции было одинаковым в SC и LC, но отличалось от F образцов.

Показано, что при скрещивании ауксотрофных штаммов *S. coelicolor* A(3)2 генотипы рекомбинантного потомства в F образцах отличаются от SC и LC. Так, частота вхождения дистальных маркеров донорного штамма в реципиентный штамм в F образцах была значительно выше, чем в SC и LC, что указывает на более длительное существование анастомозных мостиков между скрещиваемыми штаммами в условиях невесомости. Это может увеличивать горизонтальный перенос генетического материала среди микроорганизмов и приводить к образованию рекомбинантного потомства с новыми физиолого-биохимическими характеристиками и повышенными адаптивными способностями.

## Эффективная система скрининга мутаций, нарушающих функцию формирования трансмембранного канала у энтомоцидных Cry-белков, на основе мониторинга токсичности при экспрессии в клетках *Escherichia coli*

Воюшина Н.Е., Левитин Е.И., Залунин И.А., Честухина Г.Г.

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1. e-mail: [nevoyushina@genetika.ru](mailto:nevoyushina@genetika.ru)

Cry белки или дельта-эндотоксины образуются при споруляции почвенной бактерии *Bacillus thuringiensis*. Для них характерна высокая токсичность по отношению к широкому спектру беспозвоночных за счет формирования трансмембранных каналов в клетках эпителия кишечника. Активная часть белка (истинный токсин), формирующаяся в ходе протеолиза нерастворимого предшественника, состоит из трех доменов: I - ответственный за формирование трансмембранного канала, II - за связывание с рецептором на поверхности мембраны, III - за стабилизацию структуры и динамику взаимодействия первого и второго домена. Согласно многим данным, формирование канала происходит при участии  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$ -спиралей первого домена. Тем не менее, протеолитическое отщепление от белка Cry9A этого участка не влияет на токсичность, что возможно объясняется кооперативным взаимодействием субфрагментов.

Изучение поведения мутантных вариантов белка могло бы пролить свет на роль каждого участка молекулы в образовании каналов. Сайт-направленный мутагенез оказывается малоэффективным, поскольку лишь небольшой процент из предсказанных аминокислотных замен существенно влияет на активность белка. Мы обнаружили, что фрагменты гена дельта-эндотоксина *cry9A*, кодирующие I домен истинного токсина, при экспрессии в клетках *Escherichia coli* проявляют ярко выраженные токсические свойства, выражающиеся в крайне замедленном росте колоний и неспецифическом лизисе. Поскольку проявление токсического эффекта снимается при наличии в среде осмотических стабилизаторов, можно предположить, что токсичность определяется формированием трансмембранных пор молекулами токсина. Мы создали экспрессионную кассету, содержащую фрагмент гена *cry9A* (I и часть II домена) транскрипционно слитый с фрагментом белка бетагалактозидазы (*lacZ*), экспрессирующийся под контролем *lac* промотора. Данная конструкция позволяет эффективно вести отбор мутантных вариантов белка, лишенных порообразующей активности, по улучшению роста колоний при их экспрессии в *E. Coli*. Наличие ферментативного маркера позволяет легко выбраковывать варианты белка, несущие нонсенс мутации или неэффективно экспрессирующиеся.

Мутанты, отобранные при помощи этой системы, были протестированы на протопластах дрожжей. Показана полная корреляция лизиса протопластов дрожжей и угнетения роста клеток *E. coli* для каждого мутанта.

В дальнейшем мы планируем экспрессировать полноразмерные варианты Cry-белка, содержащие отобранные фрагменты, в клетках *Bacillus thuringiensis*, и изучить их токсичность для насекомых.

## Создание продуцента липазы BTL2 на основе дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Выборная Т.В.

ФГУП ГосНИИгенетика, 117545, г. Москва, 1-й Дорожный пр-д, д.1  
e-mail: [Tatyana-vybornaya@yandex.ru](mailto:Tatyana-vybornaya@yandex.ru)

Микробные липазы широко используются в промышленности для этерификации и переэтерификации различных жиров. Одной из наиболее перспективных промышленных липаз является липаза BTL2 *Bacillus thermocatenuatus*. Преимуществом липазы BTL2 является высокая термостабильность и устойчивость к детергентам и органическим растворителям, однако культивирование термофильных *B. thermocatenuatus* требует температуры 60-70<sup>0</sup>С, что является достаточно дорогим процессом. Гетерологичная экспрессия генов термофильных микроорганизмов в дрожжах *Yarrowia lipolytica* позволяет вести культивирование при температуре 28-30<sup>0</sup>С, что значительно снижает стоимость целевого продукта.

Целью данной работы является создание продуцента липазы BTL2 на основе дрожжей *Yarrowia lipolytica*.

До настоящего момента времени липаза BTL2 не была экспрессирована в *Yarrowia lipolytica*, поэтому для оценки эффективности гетерологичной экспрессии был создан модельный штамм-продуцент. Ген BTL2 был экспрессирован под регуляцией сильного неконститутивного промотора XPR2; в качестве сигнальной последовательности использовали PrePro-последовательность XPR2. Активность полученного штамма продуцента в культуральной жидкости составляет 30 ед/мл, при этом удельная активность составляет 22000 ед/мг белка. Дальнейшая работа по оптимизации активности штамма предполагает замену промотора на более сильный, а также повышение копияности гена BTL2.

Ранее в нашей лаборатории был сконструирован ряд векторов для множественной интегративной трансформации *Y. lipolytica*, содержащих дефектный маркер *ura3d4*, участки интеграции Zeta и различные транскрипционные элементы, в том числе сильный синтетический квази-конститутивный промотор *hp4d*. Также разработана Cre-Lox система сайт-специфической рекомбинации для многократного использования селективного маркера в последовательных трансформациях, что теоретически дает возможность ввести неограниченное количество копий. Разработанные подходы были применены для оптимизации экспрессии гена YLLIP2 в дрожжах *Yarrowia lipolytica*. Полученный штамм продуцент показывает 500-кратное увеличение продуктивности липазы по сравнению с диким штаммом.

Мы предполагаем применить описанные методы для повышения продукции липазы BTL2 в дрожжах *Yarrowia lipolytica*. Дальнейшая работа по оптимизации активности штамма помимо повышения количества копий связана с поиском неизученных сильных промоторов *Y. lipolytica* и разработкой подходов для конструирования новых, синтетических. Другим направлением исследований является изучение возможности иммобилизации липазы на поверхности клеточной стенки, что имеет перспективы в биотехнологическом процессе получения биодизельного топлива.

## **Модификации процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антиген-связывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител**

Вятчанин А.С., Тиллиб С.В.

*Институт Биологии Гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова 34/5  
e-mail: [anton.vyatchanin@gmail.com](mailto:anton.vyatchanin@gmail.com)*

В работе предложено использовать модифицированную версию фага-помощника для повышения эффективности отбора антиген-узнающих доменов антител методом фагового дисплея. Отличием данной работы от предшествующих является как использование новой делеции N-конца геномной последовательности белка рIII фага M13KO7 (нарушающей способность фага заражать клетки бактерий, но не мешающей формированию фаговой частицы), так и то, что данная модификация технологии используется для селекции переменных доменов особых «одноцепочечных» антител (мини-антител), обнаруженных в природе в норме лишь у представителей семейства верблюдовых.

Полученный нами мутантный фаг-помощник может быть накоплен и выделен в препаративных количествах с помощью стандартной процедуры с такой же или лишь немного меньшей эффективностью, что и исходный фаг-помощник. Полное отсутствие способности заражать бактерии у мутантного фага-помощника, делает возможным использование его для блокировки неспецифической сорбции фаговых частиц при проведении селекции.

Использование мутантного фага в качестве собственно фага-помощника обладает преимуществом, связанным с тем, что «спасение» отдельных клонов мини-антител происходит только в тех случаях, когда фаговая частица обладает полноценным рIII белком капсида, соединенным с мини-антителом. Фаговые частицы, несущие только укороченную версию рIII, теряются при следующем заражении клеток.

Мы провели модельный эксперимент, в котором сравнивали эффективность отбора клонов из полученной нами ранее библиотеки мини-антител как с помощью традиционной процедуры фагового дисплея, так и с помощью модифицированной процедуры с использованием мутантного фага-помощника. Из проведенных исследований можно заключить, что использование описанного в данной работе мутантного фага hrΔMврIII в качестве средства, блокирующего неспецифические сайты сорбции фага M13, а также в качестве собственно фага-помощника может заметно повысить эффективность процедуры селекции. В частности, помочь отобрать специфические, но исходно представленные в незначительном количестве и поэтому часто теряющиеся при селекции мини-антитела.

## Филогенетический анализ гликозил-гидролаз семейства GH70

Гизатуллина Д.И.<sup>1</sup>, Наумов Д.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский Государственный Университет, 420008, Россия, Казань, Кремлевская ул., д. 18, e-mail: [venus\\_dia@yahoo.com](mailto:venus_dia@yahoo.com)

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, e-mail: [daniil\\_naumoff@yahoo.com](mailto:daniil_naumoff@yahoo.com)

Семейство GH70 гликозил-гидролаз объединяет несколько десятков белков. Среди них представлены альтернансахаразы [К.Ф. 2.4.1.140], декстрансахаразы [К.Ф. 2.4.1.5] и реутерансахаразы [К.Ф. 2.4.1.-].

В работе анализировались белки из базы данных NCBI. Множественное выравнивание 39 GH70-доменов выполнено в программе-редакторе BioEdit (очень похожие последовательности и короткие фрагменты были исключены из анализа). Полученное множественное выравнивание использовали для построения филогенетических деревьев с помощью программ из пакета PHYLIP.

При построении деревьев в качестве внешней группы использовался уникальный циклическипермутированный GH70-домен из бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (NCBI, ACB62096). Он имеет наименьший уровень сходства с другими представителями семейства. Все остальные домены на древе образуют два кластера с высокой бутстреп-поддержкой. Один из них образован тремя ортологами из разных штаммов *Lactobacillus reuteri*. Во втором кластере могут быть выделены два основных субкластера. Один из субкластеров содержит остальные GH70-домены из *L. reuteri*. Другой субкластер включает в себя большинство известных GH70-доменов и содержит устойчивую группу, образованную всеми GH70-доменами из *Streptococcus*.

Пять наиболее дивергентных представителей семейства GH70 (NCBI, AAA26898, AAG61158, AAS79426, AAU08004 и AAU08003) были выбраны на основе данных филогенетического анализа и использованы в качестве запросов для скрининга базы данных с помощью программы PSI-BLAST. Две итерации с каждым из них позволили получить в общей сложности 3660 белков. Все найденные белки содержали домены, относящиеся к семействам GH13 или GH70. Среди белков семейства GH13 были найдены представители пятнадцати подсемейств (1, 2, 4-12, 14-17, 19, 20, 23, 24, 26-32, 35 и 36) этого семейства.

Почти всегда GH70-домен расположен между доменами GH70N и COG5263. Большинство изученных белков не содержат дополнительных доменов, но некоторые имеют домены DUF1542 или REUTERI. В ряде случаев белки содержат по два GH70 или COG5263 домена. Одной из наиболее сложных доменных структур обладает глюкансахараза из *Lactobacillus sakei* (AAU08011), имеющая пять доменов. Каталитический GH70-домен является наиболее консервативным в белках, в нём можно выделить несколько высоко консервативных участков. Домены GH70N (всегда предшествует каталитическому домену GH70) и REUTERI (характерен только для *L. reuteri*) охарактеризованы нами впервые. Домены семейства GH70 представлены почти исключительно у молочнокислых бактерий, что свидетельствует о эволюционно недавнем происхождении генов, кодирующих GH70-содержащие белки. Одинаково циклически пермутированная структура доменов семейства GH13 и GH70-домена из *E. sibiricum* указывает на направление эволюции GH70-доменов.

## Нано- и микрочастицы из конденсированной ДНК, образующиеся в ходе полимеразной цепной реакции

Данилевич В.Н., Кадыков В.А., Гришин Е.В.

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; e-mail: [dan@mail.ibch.ru](mailto:dan@mail.ibch.ru).*

Обнаружен феномен образования нано- и микрочастиц ДНК в ходе полимеразной цепной реакции. Показано, что в ПЦР с генспецифическими, а также с не полностью комплементарными праймерами и с геномной ДНК дрожжей в качестве матрицы, наряду с линейными фрагментами ДНК, образуются сферические **нано- и микрочастицы и их агрегаты**, состоящие из чистой ДНК ( $K^+$  и  $Mg^{2+}$ -солей ДНК). Микрочастицы ДНК образуются на поздних этапах ПЦР и могут быть выявлены с помощью обычной световой, эпифлуоресцентной и электронной микроскопии. Микрочастицы образуются в присутствии термостабильной *KlenTaq*-полимеразы. В электронном микроскопе микросферы имеют вид сферических образований с многочисленными шипами нанометрового размера. Нано- и микросферы являются электронно-плотными образованиями, их можно визуализировать непосредственно после нанесения на опорную пленку-подложку без дополнительного контрастирования. Диаметр нано- и микросфер, образующихся в присутствии геномной ДНК дрожжей, варьирует в пределах от 0.5. до 3 мкм и составляет в среднем около 1 мкм.

Показано, что ПЦР с генспецифическими праймерами и с различными плазмидными ДНК в качестве матрицы в присутствии *KlenTaq*-полимеразы образуются крупные микросферы, средний размер которых составляет около 3 мкм. С помощью электронной микроскопии выявлено **два типа крупных микросфер**: правильной сферической формы с ровной поверхностью и эллипсоидной формы с крупными шипами. В ПЦР-ных смесях с плазмидными матрицами присутствуют также линейные агрегаты из сросшихся микросфер и объемные трехмерные конгломераты из микросфер. В ходе электронно-микроскопического анализа суспензий микрочастиц, наряду с микросферами, обнаружены также **нанофибриллы (нанонити)** из ДНК (их диаметр варьирует от нескольких до нескольких десятков нанометров, а длина достигает нескольких микрон), а также **трехмерные сетчатые структуры** из ДНК микронного размера.

Изучены некоторые свойства микрочастиц ДНК. Установлено, что микрочастицы характеризуются достаточно высокой стабильностью в воде. Однако в процессе электрофореза в буфере ТАЕ они диссоциируют на составные части, в результате связывания катионов  $Mg^{2+}$  входящей в состав буфера EDTA. Показано, что катионы  $Mg^{2+}$  абсолютно необходимы для формирования и стабилизации микрочастиц. Высказано предположение, что в основе механизма формирования микрочастиц лежит  $Mg^{2+}$ -опосредованная конденсация одноцепочечных и двухцепочечных молекул ДНК, образующихся в ходе ПЦР. Обсуждаются перспективы практического использования нано- и микрочастиц ДНК.

## Адаптивный мутагенез в системе ранних генов биосинтеза пуринов *de novo* метилотрофных дрожжей *Pichia methanolica* МН4

Дутова Т.А., Мордкович Н.Н., Цыганков Ю.Д.

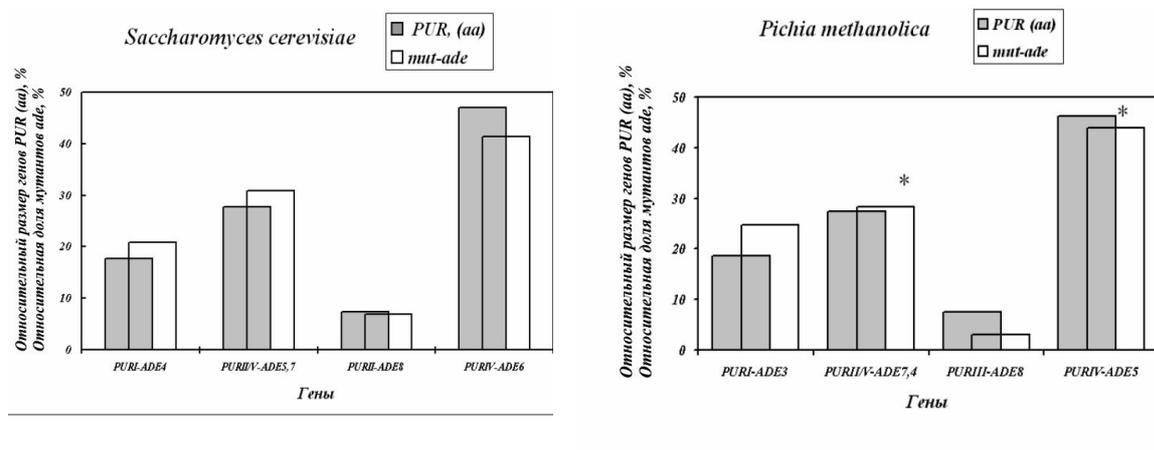
ФГУП ГосНИИ генетика, Москва 113545 1-й Дорожный пр-д. д.1.;

e-mail: [t\\_dutova@genetika.ru](mailto:t_dutova@genetika.ru)

У метилотрофных дрожжей *P. methanolica* получена коллекция спонтанных “романовских” мутантов (1654шт.) по ранним генам биосинтеза пуринов PURI-PURV от 16 исходных *ade1(pur6)* и *ade2(pur7)* штаммов. Ранее были идентифицированы два гена – бифункциональный ADE7,4(PUR2,5) и ADE5(PUR4). Для идентификации двух оставшихся ранних генов ADE3 и ADE8 был применен новый подход: сопоставление спектров спонтанных “романовских” мутантов с относительными размерами генов (по длине полипептидов в аминокислотных остатках-aa).

У дрожжей *S. cerevisiae* нами была выявлена значительная корреляция между относительными размерами генов и долей мутантов в спектре (анализ литературных данных).

Данные по усредненной длине полипептидных продуктов генов 5 ранних стадий биосинтеза пуринов 22-х видов низших эукариот были получены с использованием базы данных (PubMed). Для дрожжей *P. methanolica* нами также была выявлена корреляция между спектром спонтанных романовских мутантов и относительными размерами генов. На этом основании ген ADE3 был идентифицирован как PURI, а ген ADE8 как PURIII.



Спонтанный мутагенез, приводящий к появлению “романовских” мутантов, вероятнее всего, связан с транскрипционной активностью ранних генов, что хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными о корреляции спектра мутантов с размерами генов. Высказано предположение, что в основе эффекта Роман может лежать адаптивный мутагенез – усиление транскрипции ранних генов в ответ на стресс, накопление токсичных метаболитов (АИР или КАИР) при блоке 6-7 стадии биосинтеза пуринов.

## Получение внутриклеточной аминоксилазы *Escherichia coli*

Епремян А.С., Арцруни Г.К.

ООО “БИО-ХИМ”, 0051, РА, г. Ереван, ул. Мамиконяцц, 58а/10

e-mail: [blackeye03@rambler.ru](mailto:blackeye03@rambler.ru)

Фермент аминоксилаза гидролизует амидные связи N-ацилированных аминоксилов. В отличие от сравнительно хорошо изученных внеклеточных ферментов аминоксилаз, внутриклеточные аминоксилазы охарактеризованы недостаточно.

Целью работы является изучение внутриклеточной аминоксилазы *Escherichia coli*. Было найдено, что в логарифмически растущей культуре *E. coli*, обладающей аминоксилазной активностью, внутриклеточная аминоксилаза проявляет значительную ферментативную активность в стационарной фазе роста клетки. Исходя из этого, для выделения исследуемого фермента были использованы клетки *E. coli*, обладающие аминоксилазной активностью, в стационарной фазе. Клеточный экстракт был получен с помощью разрушения клеток на ультразвуковом дезинтеграторе с последующим центрифугированием при 13000 об/мин, 5 мин, +4° С. Осаждение фракции нуклеиновых кислот проводили сульфатом стрептомицина (конечная концентрация 1мг/мл). Фракционированием сульфатом аммония при 55% и 80% насыщении и последующей хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе при рН 7.0 в градиенте концентрации фосфатного буфера от 0.1 до 0.7 М в присутствии 1мМ СоСl<sub>2</sub> и 1мМ дитиотрейтола – удалось освободиться от значительной части балластных белков. При повторной хроматографии активных фракций исследуемого фермента на ДЭАЭ – целлюлозе при рН 5.8 внутриклеточная аминоксилаза *E. coli* элюируется при использовании градиента концентрации хлористого натрия 0.1-1.0 М в исходном буфере. По разработанной схеме удалось получить из 10 г биомассы 1.5 мг активного препарата фермента с общим выходом по активности 40% и с очисткой в 400 раз.

## Роль районов 1.1 и 3.2 сигма-субъединицы РНК-полимеразы *Thermus thermophilus* в инициации транскрипции

Жилина Е.В., Басс И.А., Кульбачинский А.В.

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. академика Курчатова, д. 2, e-mail: [katerina-zhilina@rambler.ru](mailto:katerina-zhilina@rambler.ru)

Сигма-субъединица РНК-полимеразы (РНКП) бактерий является многофункциональным транскрипционным фактором, который принимает участие в узнавании промоторов и плавлении ДНК в ходе инициации транскрипции, а также в процессах инициации синтеза РНК и ухода полимеразы с промотора. Сигма-субъединицы всех бактерий содержат четыре эволюционно-консервативных района, каждый из которых включает несколько подрайонов. Ранее было показано, что районы 2 и 4 принимают участие в узнавании промоторных элементов. Функции остальных районов (1 и 3) изучены недостаточно. Исследование мутаций в сигма-субъединице РНКП *Escherichia coli* позволило предположить, что N-концевой район 1.1 сигма-субъединицы важен для образования открытого промоторного комплекса, а район 3.2 принимает участие в инициации синтеза РНК и уходе РНКП с промотора. Анализ трехмерной структуры холофермента РНКП термофильной бактерии *Thermus thermophilus* показал, что район 1.1 сигма-субъединицы находится внутри ДНК-связывающего канала и в ходе инициации транскрипции может конкурировать с ДНК спереди по ходу транскрипции. Район 3.2 располагается вблизи активного центра РНКП и может принимать участие в связывании инициаторных нуклеотидов, а также конкурировать с новосинтезированной РНК в процессе инициации. Целью нашей работы являлось получение биохимических данных о роли районов 1.1 и 3.2 сигма-субъединицы в инициации транскрипции РНКП *T. thermophilus* и сравнение их с имеющимися данными для РНКП *E. coli*.

В ходе работы были получены сигма-субъединицы *T. thermophilus* с делецией района 1.1 (аминокислоты 1-74), а также с делециями различного размера в районе 3.2 (322-326, 319-328 и 318-329). Было исследовано влияние данных мутаций на транскрипционную активность РНКП *T. thermophilus*, узнавание промоторов и процесс ухода РНКП с промотора. В результате было установлено, что делеции районов 1.1 и 3.2 сигма-субъединицы не влияют на узнавание и плавление промоторов при оптимальной температуре транскрипции для данной РНКП (60°C). В то же время, делеции в районе 3.2 нарушают плавление промоторов при пониженной температуре (37°), что указывает на возможную роль данного района в формировании открытого промоторного комплекса. Было показано, что делеции в обоих исследуемых районах сигма-субъединицы РНКП нарушают инициацию синтеза РНК даже в условиях температурного оптимума. Было установлено, что делеция района 1.1, хотя и не влияет на синтез коротких РНК-транскриптов, нарушает уход РНКП с промотора и приводит к потере способности фермента синтезировать полноразмерные транскрипты. Таким образом, данный район сигма-субъединицы *T. thermophilus* важен для перехода от инициации транскрипции к элонгации. Делеции в районе 3.2 сигма-субъединицы нарушают синтез РНК любой длины и, таким образом, данный район, вероятно, важен для связывания инициаторных нуклеотидов в активном центре РНКП и/или катализа синтеза РНК в ходе инициации.

## Свойства глюкозооксидазы рекомбинантного штамма *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1.17

Жуковская Л.А., Михайлова Р.В., Семашко Т.В., Лобанок А.Г.

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», 220141, Беларусь, г. Минск,  
ул. Купревича, 2; e-mail: [enzyme@mbio.bas-net.by](mailto:enzyme@mbio.bas-net.by)

Глюкозооксидаза (ГО) ( $\beta$ -D-глюкозо: O<sub>2</sub>-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4.) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление  $\beta$ -D-глюкозы до  $\beta$ -D-глюконолактона и пероксида водорода. Она широко используется в пищевой промышленности в качестве антиоксиданта и консерванта; в медицине – в качестве диагностического и терапевтического средства; в химической промышленности - для получения гидрохинона, глюконовой кислоты и её солей. Ранее в лаборатории ферментов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» при помощи метода электропорации получен рекомбинантный штамм *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, характеризующийся повышенным уровнем синтеза ГО, выделен и очищен фермент гриба. Цель настоящей работы – изучение основных физико-химических свойств ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17.

Изучено влияние pH (2-12) и температуры (20-90°C) на активность ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17. Установлено, что максимальная каталитическая активность фермента проявляется в интервале значений pH 4,0-7,0. Активность ГО увеличивается при повышении температуры реакционной среды с 20°C до 50°C, в диапазоне 50-70°C создаются оптимальные условия для действия фермента. Дальнейшее повышение температуры до 90°C приводит к снижению каталитической активности ГО вследствие тепловой денатурации ферментного белка.

При анализе pH-стабильности ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 установлено, что 100% активности фермента сохраняется при pH 4,0-5,0 в течение 24 ч (20°C). Оценка влияния pH среды на активность фермента после 24 ч инкубации позволяет сделать вывод, что ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 более стабильна при значениях pH 3,0-7,0, остаточная активность составляет 85,11-100,0%. При pH 8,0 сохраняется 55,17% ГО, а после суточной выдержки фермента при pH 9,0-12,0 происходит резкое снижение его активности.

Изучение влияния температуры на стабильность ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 показало, что почти 100% активности ГО сохраняется при инкубировании ферментного раствора в течение часа при 40°C и 60% – при 60°C. Резкая инактивация фермента происходит при 70°C. Эффективная константа скорости инактивации ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 после часовой выдержки фермента при 20-50°C составляет  $1,67-12,12 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$  и с повышением температуры до 70°C увеличивается до  $2,17 \cdot 10^{-2} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ .

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что оптимум действия ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 проявляется в широкой области значений pH от 4,0 до 7,0 и диапазоне температур 50-70°C, фермент характеризуется высокой pH- и термостабильностью. Полученный ферментный препарат по свойствам не уступает зарубежным аналогам и может быть рекомендован для использования в клинической диагностике и производстве биосенсоров.

## **Бисенсорная установка проточно-инжекционного типа на основе иммобилизованной алкогольоксидазы для экспресс - определения спиртов**

Зайцев М.Г.<sup>1</sup>, Кузнецова Т.А.<sup>1</sup>, Решетилов А.Н.<sup>2</sup>, Рогова Т.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Тульский государственный университет, 300600, Тула, пр. Ленина 92.  
тел. (4872)351840, факс (4872)331305, e-mail: [chem@tsu.tula.ru](mailto:chem@tsu.tula.ru)

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН.  
142290, Московская область, Г.Пушино

Для целого ряда областей народного хозяйства задача по выполнению экспресс – анализа содержания спирта в образцах различной природы является актуальной. Так, в области биотехнологии можно отметить задачу, связанную с контролем ферментационных процессов при использовании спиртов метилового и этилового в качестве ростовых субстратов или трансформируемых соединений. Введение в практику экспресс – метода контроля позволит значительно повысить экономическую эффективность и качество ферментационного процесса.

Биологическое распознавание спиртов осуществляют биорецепторные элементы, сопряженные с кислородным датчиком. Наиболее перспективными являются биорецепторы на основе фермента алкогольоксидазы или целых клеток метилотрофных дрожжей, содержащих данный фермент. Основными достоинствами таких биосенсоров является простота изготовления, высокая стабильность, селективность, чувствительность и воспроизводимость.

Для создания надёжных устройств данного класса в работе были проведены исследования, связанные с поиском, выделением и изучением свойств дрожжевых алкогольоксидаз родов *Pichia* и *Hansenula* и разработка иммобилизованных биокаталитических препаратов на основе, как ферментов, так и целых клеток микроорганизмов.

В работе использована автоматизированная бисенсорная установка проточно-инжекционного типа, интегрированная с персональным компьютером со специальным программным обеспечением, который позволяет управлять режимами работы, регистрировать, обрабатывать и хранить полученные данные. Применяемая аппаратура позволяет осуществлять высокоточные измерения в наноамперном диапазоне токов.

В качестве биоматериала для изготовления рецептора можно использовать как целые дрожжевые клетки, так и выделенный из них фермент алкогольоксидаза. При этом биорецепторы на основе иммобилизованного фермента отличаются меньшим временем единичного анализа, более высокими ответами сенсора на одну и ту же концентрацию субстрата. Наилучшие потребительские свойства (чувствительность, долговременная стабильность, время эксплуатации) были получены для биорецепторов на основе алкогольоксидазы, выделенной из *Hansenula polymorpha* NCYC 945 In. Линейный диапазон определяемых концентраций для метанола составляет 0,023 до 6,5 мМ, (ПДК для водоёмов хозяйственного пользования составляет 0,09мМ) а для этанола – от 0,055 до 7 мМ (в литературе приводятся данные для линейного диапазона от 0,5 до 15 мМ). Время анализа одной пробы составляет 6 минут.

Разработанный макет биосенсора проточно-инжекционного типа позволяет проводить мониторинг ферментационных процессов получения спиртов и может стать основой при изготовлении опытного образца биосенсора.

Работа выполнялась при поддержке гранта РНП 2.1.1.7789

## Действие препаратов нитрофуранового ряда на *Quorum Sensing* и формирование биопленок у грамотрицательных бактерий

Зайцева Ю.В., Белик А.С., Хмель И.А.

Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, пл. Ак. Курчатова, 2; e-mail: [khmel@img.ras.ru](mailto:khmel@img.ras.ru)

Бактерии способны «чувствовать» повышение плотности популяции и отвечать на него быстро и скоординированно индукцией определенных наборов генов. Этот тип регуляции получил название Quorum Sensing (QS); он основан на действии низкомолекулярных сигнальных молекул различной природы (аутоиндукторов), которые накапливаются в культуре при высоких плотностях популяции бактерий и взаимодействуют с рецепторными регуляторными белками. Большинство грамотрицательных бактерий используют в качестве сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). QS системы играют ключевую роль в регуляции многих метаболических процессов клетки.

Тот факт, что QS системы участвуют в регуляции вирулентности бактерий, обуславливает необходимость изучения возможного действия на QS системы лекарственных препаратов, применяемых в медицине. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие препаратов нитрофуранового ряда, антимикробных агентов широкого спектра действия, с QS системами грамотрицательных бактерий, функционирующими с участием АГЛ. Было впервые показано, что производные нитрофуранов (фурацилин, фурагин, нитрофурантоин, нифуроксазид) в низких дозах активируют QS. В присутствии субингибиторных концентраций этих веществ в среде увеличивалась экспрессия *lux*-оперонов в штаммах *E. coli*, содержащих репортерные плазмиды с генами рецепторных регуляторных белков, взаимодействующих с АГЛ, и инактивированными генами синтаз АГЛ.

Формирование биопленок является существенным фактором, способствующим развитию бактериальных инфекций. Для патогенных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* было показано, что QS участвует в регуляции образования биопленок. Мы впервые обнаружили, что производные нитрофурана, фурациллин и нитрофурантоин, в субингибиторных концентрациях (около 50-250 мкМ) оказывают стимулирующее действие на формирование биопленок у *B. cepacia* 370 и *P. aeruginosa* PAO1.

Таким образом, данные, полученные в нашей работе, показывают, что нитрофурановые препараты в концентрациях, не ингибирующих рост бактерий, могут активировать QS и образование биопленок. Известно сходное действие субингибиторных концентраций некоторых антибиотиков на формирование биопленок и экспрессию генов, ответственных за синтез факторов вирулентности бактерий. Эта реакция бактерий на низкие концентрации лекарственных препаратов способствует выживанию патогенных бактерий после интенсивной антибиотической терапии, когда в организме присутствуют остаточные концентрации этих веществ.

## Влияние компонентов пробиотических микроорганизмов на активность роста и адгезивные свойства *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Ижик А.В.<sup>1</sup>, Новик Г.И.<sup>1</sup>, Рахуба Д.В.<sup>1</sup>, Сидоренко А.В.<sup>1</sup>, Михайлопуло К.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, 220141, Минск, ул. Купревича, 2

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

e-mail: [izhyk85@mail.ru](mailto:izhyk85@mail.ru)

Пробиотики – это живые бактерии или вещества бактериального происхождения, оказывающие при естественном способе введения в соответствующих дозах благоприятные эффекты на физиологические функции, биохимические и поведенческие реакции организма хозяина через оптимизацию его микроэкологического статуса. Важными предпосылками эффективности лечебно-профилактических препаратов, содержащих пробиотические микроорганизмы, является высокая пролиферативная активность, а также выраженные адгезивные свойства этих микроорганизмов. Таким образом, целесообразным является выделение биологически активных субстанций, которые способны влиять на процесс адгезии или могут стимулировать рост пробиотических микроорганизмов.

Из пробиотических микроорганизмов были выделены полисахаридные и липидные компоненты: полисахаридные компоненты *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ (А), *Bifidobacterium longum* В379М (В), *Bifidobacterium bifidum* 791 (С), липидные компоненты *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ, фосфолипидная фракция (D), *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ, гликолипидная фракция (Е), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (F).

В работе показано их влияние на активность роста и адгезивные свойства двух штаммов пробиотических микроорганизмов – *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ (1) и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (2). Компоненты (В) и (Е) обладают более выраженным бифидогенным эффектом, чем другие компоненты. Активность роста штамма (1) в присутствии компонента В и Е была в ~ 1,25 - 1,5 раза выше, чем в присутствии, соответственно, компонентов А, С, D, F. На рост штамма (2) стимулирующий эффект оказали компоненты А и F (активность роста в 1,5 раза выше, чем в присутствии компонентов В, С и в 1,25 раза выше, чем в присутствии компонентов D, Е). В качестве компонентов, положительно влияющих на адгезивные свойства штамма (1), можно выделить компоненты (В) и (Е) – уровень адгезии при их внесении в среду культивирования выше в 1,25 раза по сравнению с другими компонентами. В меньшей степени повышает показатели адгезии компонент D (фосфолипидный компонент *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ). Компоненты А, С и F не способствовали повышению уровня адгезии *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ. Необходимо отметить, что компоненты А (полисахаридный компонент *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ) и F (липидный компонент *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) оказывают положительное влияние на адгезивные свойства лактококков – уровень адгезии в их присутствии в 1,3 раза выше по сравнению с другими компонентами.

Таким образом, в эксперименте показано, что липидные и полисахаридные компоненты пробиотических микроорганизмов оказывают положительное влияние на активность роста и адгезивные свойства *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и в перспективе могут быть использованы в производстве пробиотических препаратов.

## Практическое использование специфических микроорганизмов для трансформации целлюлозосодержащего сырья

Касаткина А.Н.<sup>1</sup>, Градова Н.Б.<sup>1</sup>, Ушакова Н.А.<sup>2</sup>

Российский Химико-Технологический университет им. Д.И. Менделеева  
<sup>1</sup>125190, г. Москва, Миусская пл., 9, e-mail: [aekuz@muctr.edu.ru](mailto:aekuz@muctr.edu.ru), [arinuschka@km.ru](mailto:arinuschka@km.ru)

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова  
<sup>2</sup>190071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, e-mail: [ushakova@cevin.ru](mailto:ushakova@cevin.ru)

Эффективное использование фотосинтетической активности растений, разработка способов практического использования целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства, пищевой и других промышленности является одной из актуальных проблем современности.

Разнообразие природного генофонда микроорганизмов и механизмов их симбиотических и ассоциативных взаимоотношений и их функций является неисчерпаемым источником выделения микроорганизмов, обладающих специфическими свойствами, и новых идей для разработки биотехнологических процессов.

Так, экосистема моногастричных растительноядных животных является источником получения штаммов рода *Bacillus*, обладающих высокой активностью первичной деградации целлюлозосодержащих материалов и проявляющих пробиотические свойства. На основании использования штамма *Bacillus* БП-46, выделенного из слепой кишки большой полевки – моногастричной растительноядной мыши - и идентифицированного методом мультисубстратного тестирования как *Bacillus cereus*, была разработана энергосберегающая технология получения биологически активной кормовой добавки, обладающей пробиотическими свойствами, при использовании в качестве сырья зерновой дробины.

Учитывая условия природного местообитания данного штамма, был разработан способ одно- и двухстадийной твердофазной ферментации в анаэробных условиях при использовании в качестве субстрата подготовленной пивной дробины – подсушенной и измельченной.

При одностадийном культивировании *Bacillus cereus* БП-46 был получен продукт (биологически активная кормовая добавка), содержащий до 30 % сырого протеина, сырой клетчатки не более 10% и обладающий пробиотическими свойствами.

При двухстадийном процессе последовательного культивирования в анаэробных условиях штамма *Bacillus cereus* БП-46, осуществляющего ферментативный гидролиз дробины, и последующего культивирования на продуктах гидролиза дробины молочнокислых бактерий и консорциума кефирного грибка была получена биологически активная добавка, содержащая до 35% сырого протеина, сырой клетчатки не более 8%, обладающей пробиотическими свойствами с титруемой кислотностью до 120-150<sup>0</sup>Т.

## **Исследование влияния компонентов ростовой среды и интермедиатов клеточного метаболизма на активность НАД-зависимой малат-дегидрогеназы (декарбоксилирующей) из *E. coli***

Киверо А.Д., Смирнов С.В.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ») 117545, Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, 1,  
e-mail: [kiveroad@rambler.ru](mailto:kiveroad@rambler.ru)

В настоящее время одним из важных аспектов прикладной микробиологической биотехнологии является контроль переключения путей клеточного метаболизма. Из литературных данных [1] известно, что НАД-зависимая малат-дегидрогеназа (декарбоксилирующая; malic enzyme, EC 1.1.1.38, ME) из *E. coli* может работать как в направлении синтеза пирувата и НАДН, так и в направлении фиксации CO<sub>2</sub> с одновременным включением углерода в ЦТК через малат.

Ранее нами было показано, что направление работы ME зависит от активности таких путей биосинтеза пирувата как: гликолиз, путь Энтнера-Дудорова, PTS-система транспорта глюкозы. При этом значительно изменяются все ростовые характеристики культуры клеток *E. coli*.

Основной целью данной работы было определение молекулярных эффекторов, с помощью которых, клетка могла бы регулировать направление работы ME. Для этого было исследовано влияние компонентов ростовой среды и интермедиатов метаболизма на активность ME. В работе было изучено влияние следующих соединений: ацетата, 2-оксобутирата, 2-оксоглутарата, сукцината, изоцитрата, оксалоацетата, глиоксалата, аспартата, глутамата, аланина, глицина, лейцина, 6-фосфоглюконата, ацетил-СоА, СоА, MnCl<sub>2</sub>, KCl, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>.

Было показано, что в случае Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, глиоксалата, оксалоацетата, ацетил-СоА, СоА наблюдалось значительное снижение активности работы фермента в направлении синтеза малата. Fe<sup>3+</sup>, глиоксалат, оксалоацетат ингибировали активность ME, а 6-фосфоглюконат приводил к усилению активности фермента в направлении синтеза пирувата.

Полученные результаты, показывают, что направление работы ME определяется утилизацией углерода гликолизом или глюконеогенезом. Разное действие Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> говорит о том, что направление работы ME может определяться окислительно-восстановительным статусом клетки.

### **Литература:**

1. Stols L., Donnelly M.I. (1997) Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. – Appl. Environ. Microbiol., 63, 7, 2695-2701.

## Генетический перенос и экспрессия *elt*-оперона *E. coli* внутри семейства *Enterobacteriaceae* и за его пределами

Козловский Ю.Е.<sup>1,2</sup>, Алексанкин А.П.<sup>1</sup>, Степанов С.А.<sup>1,2</sup>, Абрамов О.И.<sup>1</sup>, Серебряков С.Н.<sup>1,2</sup>, Козловская Г.В.<sup>3</sup>, Тинаева Е.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ морфологии человека РАМН, Москва, 117481, ул. Цурюпы, д.3.

<sup>2</sup> ГНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева РАСХН, Московская обл. 140143, Раменский район, п. Родники, ул. Трудовая, д. 6  
e-mail: [NIIPZK@mail.ru](mailto:NIIPZK@mail.ru)

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва.

Широкое распространение генетически и иммунологически близких токсинов в весьма таксономически отдалённых группах микроорганизмов, ставят ряд вопросов, связанных с их происхождением, эволюцией и путями распространения в бактериальных популяциях.

Целью данной работы было изучение возможности конъюгативного переноса генов, ответственных за продукцию термолабильного энтеротоксина как внутри семейства *Enterobacteriaceae*, так и за его пределами.

Частота передачи признака при внутривидовом скрещивании различных штаммов *E. coli* находилась в пределах от  $3,7 \times 10^{-2}$  до  $3,1 \times 10^{-3}$  в зависимости от реципиента. При межродовых скрещиваниях частота передачи была ниже, от  $2,8 \times 10^{-4}$  для *Salmonella enteritidis* до  $1,0 \times 10^{-6}$  для *Enterobacter gergoviae*. В ряде случаев нам не удалось получить конъюгационного переноса. Неудачными были попытки передачи *elt*-оперона в штаммы *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, а также представителей рода *Enterobacter* – *E. cancerogenes* и *E. dissolvens*, хотя перенос *elt*-оперона другими представителями рода был возможен. Интересно, что эти виды относительно недавно были перенесены в род *Enterobacter* из рода *Erwinia*, существенно отличающегося от других родов семейства *Enterobacteriaceae*.

Успешными оказались попытки переноса *elt*-оперона представителям других семейств – *Pseudomonas aeruginosa* и *Aeromonas hydrophila*. Частота переноса достигала  $2,1 \times 10^{-6}$ , что сопоставимо с таковой внутри семейства *Enterobacteriaceae*.

Уровень экспрессии *elt*-оперона в различном генетическом окружении, определённый с помощью количественного варианта ИФА существенно различался в зависимости от вида и достигал максимума в случае *S. enteritidis* превышая таковую у *E. coli* более чем в 6 раз.

## **Распространение способности к продукции цитотонических токсинов в популяциях энтеробактерий**

Козловский Ю.Е.<sup>1,2</sup>, Плугина И.В.<sup>2</sup>, Степанов С.А.<sup>1,2</sup>, Емельяненко П.А.<sup>2</sup>,  
Козловская Г.В.<sup>3</sup>, Алексанкин А.П.<sup>1</sup>, Хомякова Т.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ морфологии человека РАМН, Москва, 117481, ул. Цурюпы, д.3.

<sup>2</sup> ГНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева РАСХН, Московская обл. 140143, Раменский район, п. Родники, ул. Трудовая, д. 6  
e-mail: [NIPZK@mail.ru](mailto:NIPZK@mail.ru)

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва.

С помощью ПЦР, ИФА, серологических и биологических тестов изучали распространение способности к синтезу цитотонических токсинов среди энтеробактерий, изолированных из различных источников. Была исследована репрезентативная коллекция включавшая 1785 штаммов, 587 из которых были выделены из патологического материала, полученного от сельскохозяйственных животных, 321 штамм был изолирован от больных с диарейным синдромом и урологическими заболеваниями, 183 штамма были получены от клинически здоровых животных, а 694 изолированы из объектов окружающей среды.

Наиболее широко цитотонические токсины были распространены среди штаммов, изолированных из патологического материала, полученного от животных. 139 из них (23,7 %) продуцировали один или несколько токсинов. Причём наибольшее распространение имел термолабильный токсин (LT), обнаруженный в 79 случаях. Термостабильные токсины ST I и ST II в разных сочетаниях были обнаружены у 60 штаммов.

Из 321 штамма, изолированного от больных в клиниках Москвы, способность к продукции токсинов показали 41 (12,8%), причём на долю LT пришлось 13 штаммов, а остальные 28 синтезировали ST I – 16 штаммов и ST II – 12 штаммов. Интересно, что все токсигенные штаммы были выделены от больных с диарейным синдромом. Токсинообразования среди урологических штаммов обнаружено не было.

Также не было зафиксировано наличия токсигенных штаммов среди изолированных из объектов окружающей среды. Однако ПЦР анализ дал в случае 14 проб воды и почвы положительный результат не подтверждённый бактериологическим исследованием, что может быть связано с переходом токсигенных штаммов в некультивируемое состояние.

Неожиданным было наличие токсигенных штаммов среди энтеробактерий, изолированных от клинически здоровых животных. 15 из 183 штаммов (8,2%) продуцировали цитотонические токсины. Возможно, бессимптомное носительство, наряду с переходом в некультивируемое состояние, являются механизмом сохранения токсигенных энтеробактерий в природных популяциях.

## Пробиотические препараты с антитоксической активностью на основе резидентной микрофлоры

Козловский Ю.Е.<sup>1,2</sup>, Тихонова Н.Б.<sup>1,2</sup>, Емельяненко П.А.<sup>2</sup>, Плугина И.В.<sup>2</sup>,  
Серебряков С.Н.<sup>1,2</sup>, Овчарова А.Н.<sup>1</sup>, Козловская Г.В.<sup>3</sup>, Тинаева Е.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ морфологии человека РАМН, Москва, 117481, ул. Цурюпы, д.3.

<sup>2</sup> ГНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева РАСХН,  
Московская обл. 140143, Раменский район, п. Родники, ул. Трудовая, д. 6  
e-mail: [NIIPZK@mail.ru](mailto:NIIPZK@mail.ru)

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва.

Особенности формирования антитоксического иммунитета при энтеротоксикозах бактериальной этиологии делают малоэффективными традиционные парэнтеральные вакцины.

Значительно более перспективными представляются живые пероральные вакцины. Однако многочисленные попытки их создания на основе производных лабораторных штаммов также не оправдали возложенных на них надежд. Причина этого заключается в неспособности последних к колонизации желудочно-кишечного тракта, и, как следствию, быстрой элиминации до возникновения стойкого иммунного ответа.

Нами был разработан рекомбинантный антитоксический препарат на основе клонированного оперона термоллабильного энтеротоксина эшерихий (elt) с делецией в гене токсической субъединицы А и апатогенного штамма *E. coli*, изолированного непосредственно из желудочно-кишечного тракта.

Клинические испытания показали, что помимо индукции местного иммунного ответа происходит подавление действия голотоксина, за счёт конкурентного ингибирования его, продуцируемой рекомбинантным штаммом рецепторной субъединицы В. За счёт продукции микроцина С51 препарат подавляет патогенные энтеробактерии и оказывает нормализующее действие на кишечную нормофлору. Для обеспечения биологической безопасности препарата в штамм были дополнительно введены генетические детерминанты, делающие невозможной реверсию к токсическому фенотипу и спонтанному генетическому переносу в другие микроорганизмы.

## Генетическое родство дрожжей *Zygowilliopsis*: новые виды

Кондратьева В.И., Наумова Е.С., Наумов Г.И.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов

Москва 117545, 1-й Дорозный пр., д. 1, e-mail: [gnaumov@yahoo.com](mailto:gnaumov@yahoo.com)

Проведено молекулярно-генетическое изучение 36 природных штаммов дрожжей *Zygowilliopsis*, выделенных в различных регионах мира и хранящихся в коллекциях как *Z. californica*, *Hansenula dimenna* и *Pichia populi*.

Филогенетический анализ последовательностей района D1/D2 гена 26S рРНК показал, что род *Zygowilliopsis* не является монотипичным. Все изученные штаммы разделились на два основных кластера. Первый со 100%-ой достоверностью объединил штаммы, имеющие практически идентичные последовательности района D1/D2 с типовой культурой *Zygowilliopsis californica* CBS 252. Во второй кластер попали 5 изолятов из Японии и 4 из Северной Америки (*Pichia populi*). Различия по последовательностям района D1/D2 составили у штаммов этого кластера от 30 до 43 нуклеотидных замен, что указывает на их видовой статус. Внутри кластера выделяются две подгруппы. Первую сформировали 4 изолята из Японии (*Zygowilliopsis* sp. 1), пятый японский штамм во втором кластере занимает отдельную ветвь (*Zygowilliopsis* sp. 2). Во вторую подгруппу входят 3 штамма *P. populi* (*Zygowilliopsis* sp. 3). К этой подгруппе примыкает четвертый штамм *P. populi* (*Zygowilliopsis* sp. 4).

Шестнадцать штаммов, представляющих дрожжи обоих кластеров, скрещивались с эталонным штаммом *Z. californica* CBS 5760, что подтверждает их принадлежность к роду *Zygowilliopsis*. Анализ продуктов мейоза позволил разделить штаммы на две группы, соответствующие двум филогенетическим кластерам. В первую вошли штаммы, имеющие хотя и пониженную жизнеспособность гибридных аскоспор (4 – 68%), но нормальное мейотическое расщепление ауксотрофных маркеров. Это указывает на принадлежность их к виду *Z. californica*.

Дрожжи второй группы в скрещиваниях со штаммом CBS 5760 образовывали низкофертильные гибриды, а при анализе случайной выборки аскоспор показали характерное для межвидовых скрещиваний аномальное расщепление по использованным маркерам. Подавляющее число моноспоровых клонов было прототрофным, моноауксотрофные сегреганты встречались крайне редко, рекомбинантные двойные ауксотрофы вообще не обнаружены. Это свидетельствует об отсутствии нормального мейотического деления – редукции хромосомного набора. Аналогичные гибриды получены также в скрещиваниях североамериканского штамма *P. populi* (*Zygowilliopsis* sp. 3) и японского штамма (*Zygowilliopsis* sp. 4) с остальными дрожжами второй группы и между собой. Полученные результаты позволяют утверждать о наличии пяти биологических видов в роде *Zygowilliopsis*. Дрожжи, ранее известные как *Hansenula dimenna*, отнесены как к виду *Z. californica*, так и к новому виду *Zygowilliopsis* sp. 1.

Таким образом, молекулярные и генетические данные указывают на необходимость пересмотра видового состава дрожжей *Zygowilliopsis* и родовой принадлежности дрожжей *P. populi*.

## Технология производства рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в промышленных масштабах

Кононова Н.В.<sup>1</sup>, Бобрускин А.И.<sup>1</sup>, Косарев С.<sup>2</sup>, Пучков И.А.<sup>1</sup>, Свешникова Е.В.<sup>1</sup>, Демин А.В.<sup>1</sup>, Баирамашвили Д.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российская фармацевтическая компания ЗАО «Мастерклон» 127473, г. Москва, 1-ый Волконский пер., д. 11, стр.2,

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
e-mail: [alexeybob@rambler.ru](mailto:alexeybob@rambler.ru)

В последнее время биотехнологическое производство лекарственных препаратов начинает занимать лидирующие позиции в фармацевтической промышленности, поскольку имеет особое значение для устойчивого развития современной медицины. Разработка и успешное применение таких технологий определяет инновационный потенциал страны в стремительно развивающемся секторе биофармацевтических лекарственных средств. В настоящее время в медицинской практике успешно применяется большое количество, действующим веществом которых являются рекомбинантные белки.

Основной задачей данной работы являлось создание технологии промышленного производства активной фармацевтической субстанции (АФС) рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (рГ-КСФ).

Для решения поставленной задачи использовали высокопродуктивный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pES3-7, [Патент.РФ №2260049] способный осуществлять синтез рГ-КСФ в «тельца включения» (ТВ). В процессе создания технологии были разработаны методы культивирования продуцента, выделения ТВ, промышленная схема очистки и приготовления АФС, которая состоит из стадий солюбилизации, ренатурации белка, ионообменной и гель-проникающей хроматографии. Также были разработаны методы контроля качества АФС рГ-КСФ и утверждена нормативная документация – ФСП 42-0549-6839-05. Внедрен стандарт качества в виде государственного стандартного образца (ГСО) – ФСП 42-0153-05. Препарат рГ-КСФ прошел успешные клинические испытания в ведущих клиниках РФ и Украины. Подтверждена его эффективность и безопасность.

Производство данного лекарственного вещества связано с возрастающей потребностью при лечении нейтропений различной этиологии, раковых заболеваний. рГ-КСФ также применяется при трансплантации костного мозга и мобилизации клеток периферической крови для трансплантации.

В результате работы была создана высокоэффективная технология производства препарата рГ-КСФ, который востребован практической медициной и удовлетворяет мировым стандартам качества. С 2008 года в РФ по данной технологии производится, готовая лекарственная форма рГ-КСФ «Нейпомакс»®.

## Сравнение уровня экспрессии и эффективности очистки рекомбинантного ИФН- $\alpha$ -2b человека с полигистидиновой системой и без неё

Кособокова Е.Н.

Российский Онкологический Научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Россия,  
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, т. 324-14-59, e-mail: [ekkos@mail.ru](mailto:ekkos@mail.ru)

Интерфероны (ИФН) широко применяются в современной медицине для профилактики и лечения вирусных заболеваний, в т.ч. различных форм гепатита, герпетических поражений кожи и слизистых оболочек, вирусных заболеваний глаз, а также при комбинированной терапии ряда злокачественных и доброкачественных новообразований.

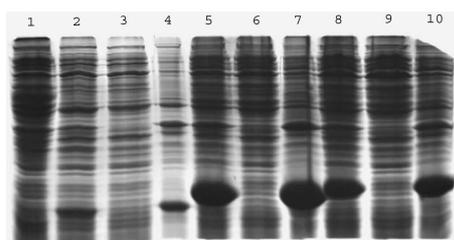
Для применения в клинике необходимо получение высокоочищенных субстанций. Современные препараты соответствуют требованиям к качеству очистки, но поступают на потребительский рынок с ценами, недоступными для многих больных. Остаётся актуальной проблема оптимизации процесса получения и очистки ИФН с целью его упрощения и удешевления. Этому вопросу посвящены наши исследования. Мы синтезировали две генетические конструкции ИФН- $\alpha$ -2b с полигистидиновой системой (с одним 6His на N-конце и двумя 6His на C- и N-конце). Для сравнения клонировали последовательность полностью идентичную нативному белку. Во всех вариантах кодоны заменены на соответствующие часто используемые в *Escherichia coli*.

Для экспрессии использовали штамм *E.coli* BL21(DE3). Экспрессируемый белок во всех вариантах полностью агрегировался в виде телец включения (рис.1: 4, 7, 10), что позволило провести первичную отмывку. Благодаря наличию полигистидиновой системы провели очищение белка при помощи сорбента с иммобилизованными ионами  $Ni^{2+}$ . Конечный продукт очищен более чем на 90%.

В ходе работы получены следующие результаты:

1. Наличие полигистидиновой системы увеличивает уровень экспрессии рекомбинантного ИФН- $\alpha$ -2b человека. При этом второй 6His на C-конце несколько снижает ее (рис. 1: 2, 5, 8).
2. Первичная очистка на этапе ТВ необходима для ИФН- $\alpha$ -2b-6His, т.к. увеличивает эффективность посадки белка на сорбент и качество отмывки белков бактериальной клетки. В случае ИФН- $\alpha$ -2b и ИФН- $\alpha$ -2b-12His необходимо изменение состава промывочных буферов, т.к. часть целевого белка уходит в смывы.
3. Наличие дополнительной гистидиновой последовательности на C-конце не влияет на эффективность посадки белка на колонку и емкость сорбента.

На основании полученных результатов мы пришли к следующему предварительному выводу: в отношении уровня экспрессии и эффективности очистки наиболее удачна конструкция с одним 6His на N-конце.



**Рис. 1.** Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле

1 – Лизат клеток BL21(DE3), не несущий рекомбинантной плазмиды. 2-4 – Лизат (2), супернатант (3) и осадок (4) после центрифугирования лизата клеток BL21(DE3), экспрессирующих ИФН- $\alpha$ -2b. 5-7 – Лизат (5), супернатант (6) и осадок (7) после центрифугирования лизата клеток BL21(DE3), экспрессирующих ИФН- $\alpha$ -2b-6His. 8-10 – Лизат (8), супернатант (9) и осадок (10) после центрифугирования лизата клеток BL21(DE3), экспрессирующих ИФН- $\alpha$ -2b-12His.

## Дегградация дизельного топлива *Rhodococcus erythropolis* Ac-858 T

Костина Е.Г., Атыкян Н.А., Ревин В.В.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, 430000, г. Саранск,  
ул. Большевикская, д. 68; e-mail: [kostinalena@rambler.ru](mailto:kostinalena@rambler.ru)

Биодеградация нефтепродуктов в природе – сложный многоступенчатый и чрезвычайно длительный процесс, осуществляемый сообществом почвенных микроорганизмов. Однако зачастую углеводороды вымываются грунтовыми водами и попадают в подземные и поверхностные водоёмы, а соответственно, и в организм человека и животных. Разработка и совершенствование технологий биоремедиации, особенно почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, в настоящее время является областью активных прикладных и фундаментальных исследований. Одними из перспективных деструкторов нефтепродуктов являются микроорганизмы, относящиеся к роду *Rhodococcus*. Это обусловлено продуцированием широкого спектра ферментных комплексов и липофильной природой их клеточной оболочки.

В связи с этим целью нашей работы являлось изучение влияния концентрации дизельного топлива (модель углеводородного комплекса) на процесс деградации данного субстрата в процессе роста *Rhodococcus erythropolis*.

В ходе проведения эксперимента было установлено, что при внесении 1% дизельного топлива на 0 сутки культивирования бактерии, к 10 суткам роста наблюдалась максимальная убыль дизельного топлива и составляла 64%. При внесении в среду 5% дизельного топлива убыль его возрастала также как и в первом случае к 10 суткам роста культуры и составляла 58%. Сравнивая полученные данные по убыли дизельного топлива в культуре *Rhodococcus erythropolis*, можно отметить одинаковые закономерности влияния концентрации углеводорода, не смотря на то, что в варианте с 5% дизельного топлива суммарная убыль ниже, чем в 1% дизельного топлива.

Таким образом, бактерии *Rhodococcus erythropolis* способны активно деструктировать углеводороды нефтепродуктов, что может найти широкое применение в технологиях биоремедиации окружающей среды.

## Определение пуриновых 5'-нуклеотидов рибозного ряда методом планарной хроматографии

Красиков В.Д.<sup>1</sup>, Малахова И.И.<sup>1</sup>, Тяглов Б.В.<sup>2</sup>, Лобанов К.В.<sup>2</sup>, Прошкин С.А.<sup>2</sup>, Королькова Н.В.<sup>2</sup>, Миронов А.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ЗАО НТЦ «Ленхром», Россия, 199004, г. Санкт-Петербург, В.О. Большой проспект, д.31, e-mail: [lenchrom@hq.macro.ru](mailto:lenchrom@hq.macro.ru)

<sup>2</sup> ФГУП ГосНИИгенетика, 117545 Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д.1. e-mail: [b\\_tyaglov@genetika.ru](mailto:b_tyaglov@genetika.ru)

Для разделения 5'-нуклеотидов в подавляющем большинстве работ в качестве стационарных фаз использовали целлюлозу или РЕИ-целлюлозу, нанесенную на подложку, а также хроматографическую бумагу. В последнее время разделение смесей нуклеотидов и азотистых оснований осуществляли на циано-N-пропил-, amino-N-пропил- и этилендиамин-N-пропилсиликагелях. В некоторых случаях использовали двумерный вариант разделения. Данные по разделению 5'-нуклеотидов на немодифицированных силикагелях в литературе практически отсутствуют [1]. Необходимо отметить, что ТСХ пластинки на основе целлюлозы и ее модифицированных форм в России не выпускаются и имеют весьма высокую стоимость.

Нами, с помощью модели «Призма» [2], была разработана трехкомпонентная хроматографическая система (пропанол-2 + 25% водный раствор аммиака + вода) позволяющая осуществить разделение 5'-АМФ, 5'-ГМФ, 5'-ИМФ (величины R<sub>f</sub> 0,46, 0,16 и 0,28 соответственно) на отечественных высокоэффективных ТСХ пластинках «Сорбофил» (ЗАО НТЦ «Ленхром», Россия). Азотистые основания и нуклеозиды, которые, как правило, присутствуют в культуральных жидкостях, не препятствовали определению нуклеотидов, поскольку их пятна локализовались вблизи линии фронта, а пятна пигментов оставались на линии старта.

Количественное определение нуклеотидов проводили на видеоденситометре «Ден-Скан-04» (ЗАО НТЦ «Ленхром», Россия). Относительные погрешности среднего при измерениях не превышали 5% (n=3, P= 0,95).

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 08-08-00710-А.

### Литература:

1. Hand Book on Thin Layer Chromatography. Ed. J.Sherma and B.Fried. (2007) – N-Y.-London. Plenum Press., 1317p.
2. Красиков В.Д. (2005) Основы планарной хроматографии. – Спб.: Химиздат. 231с.

## Бактериальные антагонисты микроводорослей

Кузнецова Н.И., Азизбемян Р.Р.

ФГУП ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-ый Дорожный проезд д. 1.

e-mail: [nikuzn@genetika.ru](mailto:nikuzn@genetika.ru)

Микроводоросли (фитопланктон) является главным поставщиком первичного органического вещества природных водоёмов, обеспечивая все последующие пищевые цепи в водных экосистемах, и в большой степени формирует её качество. В тоже время, бурное увеличение численности водорослей в водоёмах приводит к неблагоприятным последствиям, таким как «цветение» воды, накопление токсинов, образованию многослойных структур – биоплёнок («матов»). Ухудшение качества воды нежелательно по отношению ко многим целям водопользования: бытовому, рекреационному, рыбо-хозяйственному, энергетическому и др. Высокая численность клеток водорослей при их отмирании может приводить к гипоксии и гибели всех аэробных организмов. Серьезный экономический ущерб делает проблему ограничения цветения микроводорослей в природных условиях чрезвычайно актуальной, о чем свидетельствует наличие в ряде стран специальных программ. Снижение численности водорослей может быть достигнуто путём использования более эффективных факторов ограничения численности водорослей, которыми могут быть микроорганизмы, нарушающие нормальное функционирование клеток водорослей.

Протестировано свыше 150 штаммов альгицидных микроорганизмов. Отобран наиболее перспективный штамм спорообразующих бактерий, обладающий антагонистическим (альгицидным) эффектом на водоросли *Nostoc*, *Anabaena*, *Microcystis*, *Cosmarium*, *Thalassiosira*, *Prorocentrum*, *Amphidinium*. При совместном культивировании штамма с микроводорослями наблюдается изменение цвета инкубационной смеси до полного обесцвечивания. При световой микроскопии выявлен лизис вегетативных клеток микроводорослей. Отобраны питательные среды и оптимизированы условия культивирования, необходимые для продуцирования штаммом высокого уровня синтеза альгицидных факторов. Изучается зависимости альгицидного эффекта на планктонные и биоплёночные формы микроводорослей в зависимости от времени действия, дозы и стрессовых условий. Для выявления времени ингибирующего действия штамма на микроводоросли изучали летальное время подавления тест-культур (планктонные: молодая, зрелая, старая, а также биоплёночная), а также ЛД<sub>50</sub>. При изучении локализации активности показано, что альгицидная активность присутствует в супернатанте и осадке, что объясняется наличием как минимум двух антибиотических факторов – секретлируемого и внутриклеточного.

Полученные результаты позволят уменьшить отрицательное воздействие, как сине-зелёных, так и других видов микроводорослей на окружающую среду и улучшить экологическую обстановку во многих регионах мира.

Показана принципиальная возможность создания биологических средств для ограничения численности микроводорослей. Предложенный метод борьбы с микроскопическими водорослями не имеет аналогов в мире.

Проект выполняется в рамках Межправительственной Программы российско-китайского научно-технического сотрудничества «Исследование ресурсов микроорганизмов и применение микроорганизмов с пестицидной активностью».

## Изучение *pfrI*-гена бактерий *Pseudomonas putida* КМБУ 4308

Кулешова Ю.М., Максимова Н.П.

Белорусский государственный университет, 220030, Беларусь, Минск, просп. Независимости, д.4, e-mail: [Yuliakuleshova@yahoo.co.uk](mailto:Yuliakuleshova@yahoo.co.uk)

Синтез пиовердинов (желто-зеленых флуоресцирующих пигментов, выполняющих функцию сидерофоров) у бактерий рода *Pseudomonas* позитивно регулируется продуктом гена *pfrI*, являющемуся гомологом PvdS-белка *P. aeruginosa* и PbrA-белка *P. fluorescens* M114. Эти белки классифицируются как альтернативные  $\sigma$ -факторы с экстрацитоплазматической функцией (ECF подсемейство)  $\sigma^{70}$  семейства.

Целью данной работы являлось клонирование *pfrI*-гена, определяющего синтез PfrI-белка у бактерий *P. putida* КМБУ 4308.

Для клонирования полномасштабного гена *pfrI* с собственным промотором, были сконструированы праймеры, позволяющие считывать последовательность ДНК *pfrI* с области связывания Fur-белка до терминирующей шпильки. Синтез гена был осуществлен с помощью метода ПЦР на матрице хромосомной ДНК *P. putida* КМБУ 4308. Полученный ПЦР-фрагмент *pfrI* гена был лигирован с мультикопийным вектором pUC19 и введен в клетки бактерий *E. coli* DH5 $\alpha$  посредством кальциевой трансформации. Анализ нуклеотидных последовательностей с помощью секвенирования показал, что клонированный фрагмент имеет длину 818 пар нуклеотидов и гомологичен генам, детерминирующим синтез  $\sigma^{70}$ -фактора ECF подсемейства *P. putida* GB-1 (90% гомологии), *P. putida* F1 (87% гомологии), *P. putida* KT2440 (87% гомологии), *P. putida* W619 ctg68 (87% гомологии) и экстрацитоплазматического  $\sigma^{70}$ -фактора *P. entomophila* L48 (86% гомологии).

Анализ родства гипотетического PfrI-белка бактерий *P. putida* КМБУ 4308 с уже известными белками –  $\sigma^{70}$ -факторами ряда видов *Pseudomonas* также показал высокую степень их гомологии, что позволяет предположить сходные механизмы их действия.

Таким образом, нами осуществлено клонирование гена *pfrI* бактерий *P. putida* КМБУ 4308, продуктом которого является белок, относящийся к экстрацитоплазматическим  $\sigma^{70}$ -факторам и выполняющий роль позитивного регулятора синтеза флуоресцирующих пигментов у бактерий рода *Pseudomonas*.

Полученные результаты могут найти применение при конструировании штаммов-продуцентов пиовердина Pm на основе бактерий *P. putida* КМБУ 4308.

## **Получение гибридных и модифицированных форм промоторов вирусов мозаики георгина и кольцевой гравировки гвоздики**

Кулуев Б.Р., Ильясова А.А., Лебедев Я.П.

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН.  
450054, г.Уфа, ул. Проспект Октября, д. 71. e-mail: [Kuluev@bk.ru](mailto:Kuluev@bk.ru)*

Одной из актуальных задач генной инженерии растений является поиск или создание сильного промотора, способного обеспечивать высокий уровень экспрессии и значительное накопление целевого белкового продукта в тканях трансгенных растений. Из природных растительных промоторов наиболее сильными оказались промоторы каулимовирусов, которые нашли широкое применение ввиду своей эффективности, универсальности и отсутствию тканеспецифичности. Из этой группы наиболее известным и распространенным является 35S промотор вируса мозаики цветной капусты. Нами были исследованы родственные ему промоторы вируса мозаики георгина (ВМГ) и вируса кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ), которые показали высокий уровень экспрессионной активности в протопластах и трансгенных растениях табака. Преследуя цели получения более сильных растительных промоторов, мы приступили к созданию гибридных и модифицированных форм промоторов ВМГ и ВКГГ. Для экспериментов были использованы промотор ВМГ размером 442 пн и промотор ВКГГ размером 501 пн. Промотор ВМГ был расщеплен рестриктазой HindIII, при этом образовались два фрагмента размерами 249 и 193 пн. При расщеплении той же рестриктазой промотора ВКГГ, были получены также два фрагмента размерами 50 и 451 пн. Фрагменты данных промоторов размерами 249 и 451 пн были лигированы T4-ДНК-лигазой, лигазная смесь амплифицирована, а полученный амплификат клонирован в векторе pKRX. В итоге был получен гибридный промотор размером 700 пн, в начале которого расположились последовательности промотора ВМГ, а в конце последовательности промотора ВКГГ. Исследуемые промоторы также содержат по одному сайту узнавания эндонуклеазы рестрикции AatII. При расщеплении промотора ВМГ этой рестриктазой, были получены фрагменты размерами 299 и 143 пн, а промотор ВКГГ дал фрагменты размерами 286 и 215 пн. После проведения перекрестных лигируваний, амплификации методом ПЦР и клонирования в векторе pKRX, были получены гибридные промоторы размерами 514 и 429 пн. Далее промоторы ВМГ и ВКГГ были амплифицированы при помощи rfu-полимеразы, при этом были получены амплификаты с «тупыми» концами, именно они и были использованы в дальнейшей работе. Исследуемые промоторы расщеплялись рестриктазой ZraI, которая также режет по «тупым» концам, при этом промотор ВМГ дал фрагменты размерами 297 и 145 пн, а промотор ВКГГ – 284 и 217 пн. Фрагмент промотора ВКГГ размером 284 пн был лигирован с полноразмерным промотором ВМГ и был получен гибридный промотор размером 726 пн. Далее фрагмент промотора ВМГ размером 297 пн был лигирован с полноразмерным промотором ВМГ, при этом был получен модифицированный промотор ВМГ размером 739 пн. Как известно, около 300 первых нуклеотидов промоторов каулимовирусов соответствуют так называемой энхансерной области. Из литературы известно, что промоторы каулимовирусов с двумя энхансерными доменами в несколько раз сильнее их природных форм. Поэтому мы предполагаем, что модифицированный нами промотор ВМГ также покажет высокую эффективность в трансгенных растениях.

## Регуляция генов, кодирующих белки семейства RhtB

Кутукова Е.А., Закатаева Н.П., Лившиц В.А.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ») 117545, Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д.1, e-mail: [ekutukova@mail.ru](mailto:ekutukova@mail.ru)

В данной работе мы продолжили исследование генов, кодирующих белки описанного ранее семейства RhtB. Мы исследовали регуляцию генов, кодирующих четыре белка этого семейства: *rhtB*, *rhtC*, *yeaS* и *yahN*, для трех из которых (RhtB, RhtC и YeaS) ранее было показано участие в транспорте аминокислот из клетки. Мы показали, что уровень экспрессии этих генов повышается во время некоторых физиологических стрессов.

До сих пор остается не вполне ясна физиологическая функция белков семейства RhtB. Одной из таких функций может быть их участие в ответе клетки на физиологические стрессы. Для экспериментальной проверки этого предположения мы исследовали влияние нескольких стрессовых состояний на уровень экспрессии генов, кодирующих эти белки. Мы сконструировали трансляционные слияния промоторной области каждого из этих генов с беспромоторным геном *lacZ* на низкокопийной плазмиде pMW119 и проверили влияние на уровень экспрессии всех четырех генов осмотического стресса. Результаты представлены на рис.1.

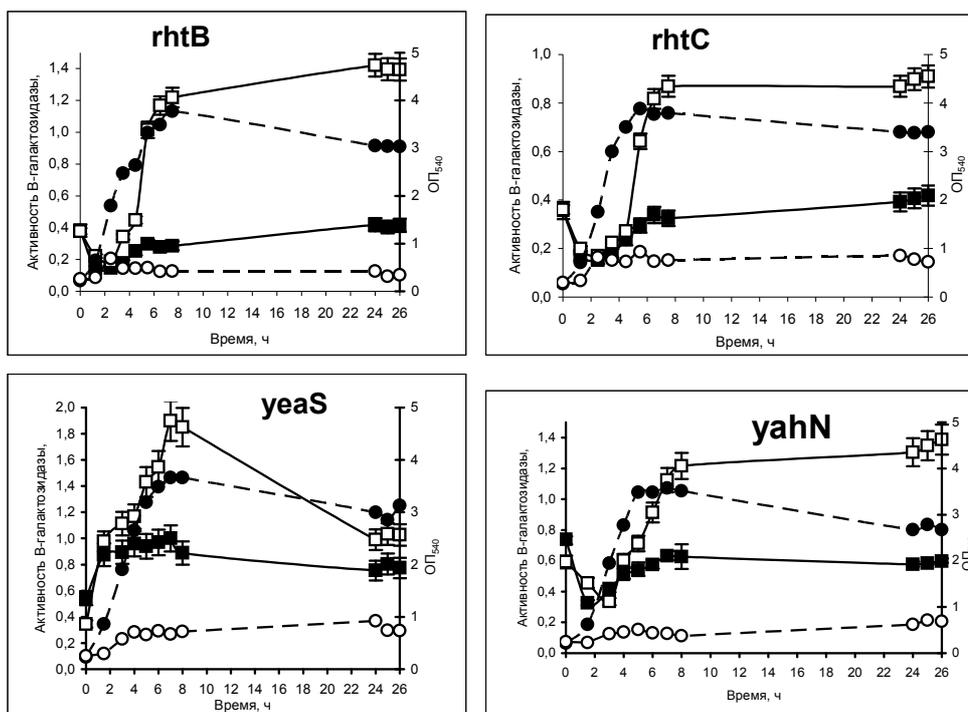


Рис.1. Влияние осмотического стресса на уровень экспрессии генов, кодирующих белки семейства RhtB.  $\square$  – активность  $\beta$ -галактозидазы на среде LB,  $\bullet$  – рост на среде LB,  $\square$  – активность  $\beta$ -галактозидазы на среде LB с добавлением 0.6M NaCl,  $\circ$  – рост на среде LB с добавлением 0.6M NaCl

Из представленных данных видно, что при осмотическом стрессе, вызванном добавлением 0,6M NaCl в стандартную среду LB, экспрессия всех четырех генов семейства через несколько часов культивирования возрастает в несколько раз. Похожие результаты мы получили при добавлении в среду 4% этанола, а также при экстремальном понижении pH. Все полученные данные говорят в пользу того предположения, что физиологическая роль белков семейства RhtB может заключаться, в том числе, в их участии в ответе клетки на физиологические стрессы.

## Микробный препарат для повышения продуктивности люцерны посевной

Ланцевич А.А., Алещенкова З.М.

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» Минск, Беларусь,  
e-mail: [ar7nica@mail.ru](mailto:ar7nica@mail.ru)

Многолетние бобовые травы, такие как люцерна, играют важную роль в кормопроизводстве благодаря своей способности приносить несколько урожаев в год богатой белком зеленой массы.

Целью настоящего исследования является разработка технологии получения комплексного микробного препарата для предпосевной обработки семян люцерны посевной (*Medicago sativa*), основанной на совместном культивировании микроорганизмов. Объектами исследования являлись штамм клубеньковых бактерий люцерны посевной *Sinorhizobium meliloti* S3 и штамм фосфатмобилизующих бактерий *Bacillus subtilis* 7; многолетняя бобовая трава люцерна посевная сорта «Будучья».

Наиболее технологичным и ресурсосберегающим способом получения комплексных инокулянтов, состоящих из diaзотрофных и фосфатмобилизующих бактерий, является их совместное глубинное культивирование с высоким содержанием жизнеспособных клеток бактериальных культур в равновесном соотношении.

Результаты изучения динамики роста отобранного штамма клубеньковых бактерий на бобовой, заводской и кукурузно-меласной средах показали, что максимальной плотности ( $7,71 \pm 1,3 \cdot 10^9$  КОЕ/мл) популяция *S. meliloti* S3 достигает через 48 час на кукурузно-меласной среде при скорости вращения качалки 200 об./мин и температуре 26-28<sup>0</sup>С. Исследование роста штаммов клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий в глубинной культуре при совместном культивировании на кукурузно-меласной среде показало, что использование культур *S. meliloti* S3 и *B. subtilis*.7 в соотношении 1:2 обеспечивает достижение числа жизнеспособных клеток, близкое к равновесному ( $1,78 \pm 0,1 \cdot 10^9$ : $1,55 \pm 0,2 \cdot 10^9$  млн КОЕ/мл среды).

При отработке технологических параметров в условиях ферментатора объемом 10 л оптимальными для роста и развития культур в составе микробного препарата были: аэрация-1л воздуха/л среды; температура культивирования -28<sup>0</sup>С; скорость вращения мешалки-200об/мин. Титры культур *S. meliloti* и *B. subtilis*.7 через 48 час максимальны и имеют следующие значения:  $9,2 \pm 1,91 \cdot 10^8$  и  $3,3 \pm 0,82 \cdot 10^8$  КОЕ/мл среды соответственно ( $\mu=0,11$  и  $0,07$  час<sup>-1</sup>,  $g=6,44$  и  $10,57$  час). На основании данных, полученных при оптимизации параметров совместного глубинного культивирования *S. meliloti* и *B. subtilis* 7 разработан лабораторный регламент на получение жидкого микробного препарата Ризофос марки «Люцерна».

Проверка эффективности микробного препарата, проведенная на опытном поле «Гушково» УО «БГСХА» в Могилевской области показала, что предпосевная инокуляция семян обеспечивает растениям более высокие темпы роста и развития, урожай зеленой массы увеличивается на 33 %. Установлено, что микробный препарат для повышения продуктивности люцерны посевной не обладает патогенными, токсическими и раздражающими свойствами и его использование в качестве удобрения не будет приводить к загрязнению почвы.

## **Новый тип дрожжевой двугибридной системы, сигнал белкового взаимодействия в которой, основан на формировании прионовых агрегатов**

Левитин Е.И.

*Государственный Научно-Исследовательский Институт Генетики и Селекции  
Промышленных Микроорганизмов, Лаборатория Химии Белка. 117545 Россия,  
Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.  
E-mail: [eugenelewitin@mail.ru](mailto:eugenelewitin@mail.ru)*

Генетические двугибридные системы (2Н) являются мощным техническим средством для выявления и изучения характера белок-белкового взаимодействия. Распространенные в настоящее время двугибридные системы основаны на активации гена репортера за счет реассоциации искусственно разделенных субъединиц белкового комплекса (например, фрагментов транскрипционного активатора), которые собираются вместе, только будучи трансляционно слитыми с полипептидами, взаимодействующими между собой. В наиболее эффективных из таких систем, экспрессия гена репортера восстанавливает возможность роста штамма в непермиссивных условиях. Сигнал взаимодействия в таких системах выявляется синхронно с экспрессией тестируемых белков, что оказывается эффективно лишь в случае лишь в случае нетоксичных белков, эффективно экспрессирующихся и сохраняющих взаимную аффинность в течение многих клеточных циклов.

Мы предложили модификацию дрожжевой двугибридной системы, в которой стадии появления сигнала в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и его детекция оказываются разделены во времени. В предложенной системе, тестируемые на взаимодействие полипептиды, экспрессирующиеся под контролем индуцируемого ионами меди *CUP1* промотора, трансляционно слиты с ДНК-связывающим и активационным доменами фактора активации транскрипции Gal4. Реассоциация доменов Gal4 в случае наличия аффинности экспрессируемых пептидов вызывает активацию Gal4-зависимого *GAL1* промотора и суперэкспрессию поставленного рекомбинантного прионформирующего N-концевого участка дрожжевого белка Sup35 (фактора терминации трансляции eRF3), что обуславливает наведение эпигенетического состояния [PSI+] за счет формирования прионовых агрегатов. Эпигенетический фенотип [PSI+] может поддерживаться в течение многих поколений клеток. Детекция измененного фенотипа проявляющаяся в эффективной супрессии носенс мутаций в составе генов вторичных генетических маркеров (*ade1-UGA*, *lys2-UGA*, *lacZ-UGA*) может быть осуществлена впоследствии, после того как экспрессия тестируемых генов уже отключена (на среде с низким содержанием меди). Представленная модификация двугибридной системы оказалась эффективной при исследовании аффинности высокотоксичных белков параспоровых кристаллов *Bacillus thuringiensis* (Cyt1A, Cry9A, p20), выявление физических взаимодействий для которых методами других генетических системах оказалось невозможным.

## Культивирование *pseudomonas auerofaciens* на жидкой фракции после спиртовой барды

Лукаткин А.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В.

Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарева, г.Саранск  
e-mail: [ussr1960@yandex.ru](mailto:ussr1960@yandex.ru)

В основе биологических способов защиты растений от фитопатогенов лежит явление микелиза, осуществляемого хитинолитическими бактериями. Наибольший интерес представляют ризосферные бактерии, так как они лучше адаптируются к условиям среды, в которых фитопатогенные грибы поражают корни растений. Постоянно ведется работа по оптимизации условий культивирования и увеличению антифунгальной активности данных бактерий.

На кафедре биотехнологии Мордовского госуниверситета им. Н.П. Огарева ведется работа по оптимизации условий культивирования бактерий *Pseudomonas auerofaciens* на жидкой фракции послеспиртовой барды.

В лабораторных условиях показано, что накопление внеклеточного белка исследуемым штаммом бактерий зависит от структуры полимера. Так максимальное количество внеклеточного белка при глубинном культивировании бактерий на среде с добавлением хитина составляет 14,8 мг/0,1мл (на 21 часы роста), а на среде с добавлением хитозана 17,7 мг/0,1мл (23 часы). В процессе культивирования бактерий наблюдалось увеличение содержания внеклеточного белка в среде, максимальное количество которого отмечено в интервале 17-23 часов роста. Большее содержание внеклеточного белка в среде с хитозаном коррелирует и с большей скоростью его гидролиза, и с большим содержанием редуцирующих сахаров в культуральной жидкости, на основании чего можно судить о лучшей ферментативной активности бактерий в данных условиях культивирования.

Таким образом, показана возможность использования полимерных субстратов – хитина и хитозана - как единственных источников углеродного питания при глубинном культивировании исследуемого штамма бактерий *Pseudomonas auerofaciens* на минеральной среде.

### 3-D моделирование агробактериального белка VirE2, участвующего в переносе T-ДНК

Мазилов С.И.<sup>1</sup>, Чумаков М.И.<sup>1,2</sup>

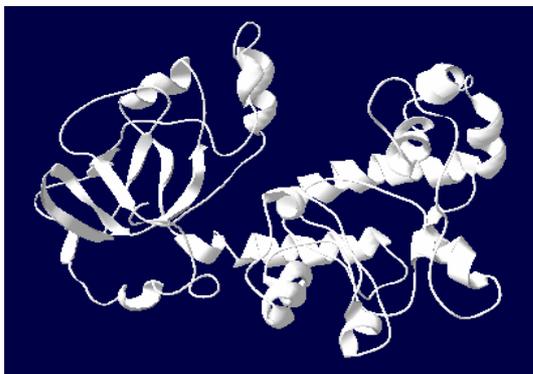
<sup>1</sup> ГОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 155, e-mail: [mazilov@mail.ru](mailto:mazilov@mail.ru)

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д.13. e-mail: [chumakov@ibppm.sgu.ru](mailto:chumakov@ibppm.sgu.ru)

*Agrobacterium* — обитающий в почве патогеном, который вызывает образование опухолей на стеблях, листьях растений (главным образом двудольных). Опухоль у растений образуется под влиянием продукции дополнительных фитогормонов, которые контролируются фрагментом бактериальной ДНК, встраиваемой в хромосому растительной клетки (Чумаков, 2001). Целью данной работы является моделирование дву-, трехмерных структур белка VirE2, который предположительно может формировать пору в клеточной мембране для переноса T-ДНК (Dumas et al., 2001).

При помощи программы RHYRE построены фрагменты трёхмерных (структурные и ленточные) вероятностных моделей белков VirE2 (со 172-ого по 529-ый аминокислотные остатки, 64% цепочки), VirE1 (56-79-ый, 29%) и VIP1 (196-248-ой, 15%) (рис. 1).

Установлено, что молекулярная поверхность смоделированного фрагмента



**Рис. 1.** Ленточный вид модели молекулы белка VirE2

белка VirE2 не имеет четко выраженной структуры распределения полярных, кислых и основных аминокислотных остатков, а белок VirE1 в составе комплекса VirE1-VirE2 имеет ярко выраженную гидрофобную поверхность. Анализ области взаимодействия смоделированных фрагментов белков VirE2 с VirE1 показал, что взаимодействие, вероятно, осуществляется с помощью водородных связей между четырьмя парами аминокислот ALA58, GLY60, LYS61 и CYS63 со стороны белка VirE1 и LEU320, SER275, SER327 и

GLU324 со стороны белка VirE2. Эксперименты на плоском бислое подтверждают гипотезу о возможности образования канала при внесении VirE2 проведены (Dumas et al., 2001),

#### Литература:

1. Чумаков М.И. (2001) Механизм агробактериальной трансформации растений. – Саратов: Слово, 256с.
2. Dumas F., Duckely M., Pelczar P., Van Gelder P. and Hohn B. An *Agrobacterium* (2001) VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 485-490.

## Значение сигнальных пептидов для транспорта в периплазматическое пространство *E.coli* рекомбинантных энтеротоксинов из *Staphylococcus aureus*

Манувера В.А., Вейко В.П.

ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
117545, Москва, 1й Дорожный проезд, д.1, e-mail: [vmanuvera@yandex.ru](mailto:vmanuvera@yandex.ru)

Ранее нами было установлено, что при гетерологичной экспрессии в *E.coli* энтеротоксинов *Staphylococcus aureus* В и Н (SEB и SEN) они локализируются в периплазме бактерий. В культуре клеток стафилококка данные токсины накапливаются в культуральной жидкости, т.е. происходит истинная секреция. Данные результаты говорят о сохранении функциональной роли сигнального пептида энтеротоксинов в *E.coli*. Однако остается неясным вопрос, является ли наличие сигнального пептида достаточным условием для трансмембранной транслокации белков. Неясно также, в какой степени сигнальные пептиды транслоцируемых белков являются взаимозаменяемыми. Для того, чтобы приблизиться к разрешению данных вопросов, мы генно-инженерными методами провели перекрестный обмен сигнальными пептидами между энтеротоксинами А, В, Н из *Staphylococcus aureus*, стрептавидином из *Streptomyces avidinii*, а также получили формы этих белков с заменой аутентичного сигнала транслокации на лидерный пептид белка *E.coli* TorA. Затем была определена внутриклеточная локализация полученных рекомбинантных белков в *Escherichia coli* K-12 MG1655 (см. Таблицу).

Из полученных результатов можно сделать вывод, что наличие сигнального пептида является необходимым, но недостаточным условием для трансмембранной транслокации. При этом нет оснований предполагать наличие неких дискретных элементов первичной структуры, отвечающих за транслокацию, в составе зрелого белка. Следует заключить, что для успешного переноса белка через плазматическую мембрану *E.coli*, необходима некая совместимость белка и сигнального пептида, хотя ее природа остается неясной. Во всех случаях в ходе выполнения данной работы, когда нам не удавалось обнаружить рекомбинантный химерный белок в периплазме, он не обнаруживался и в других клеточных фракциях (за исключением полноразмерного SEA дикого типа). Можно предположить, что вновь синтезируемый полипептид, при невозможности транслоцироваться, не может также приобрести нативную третичную структуру и подвергается протеолизу. В тоже время, данные полипептиды, не связанные с сигнальным пептидом (зрелые SEA, SEN, SEB), устойчивы в цитоплазме *E.coli*. Возможно, данный эффект обусловлен связыванием растущего полипептида, имеющего в своем составе лидер, с шапероном SecB, препятствующим фолдингу.

Таблица		БЕЛОК			
		SEA	SEB	SEN	SAV
сигнальный пептид	SEA	- *	-	-	-
	SEB	+	+	+	-
	SEN	-	+	+	+
	SAV	+	+	+	+
	TorA	+	+	+	-

Накопление рекомбинантных белков в культурах клеток *E.coli* K-12 MG1655

“+” – белок накапливается в периплазме,  
“-” – белок в периплазматической фракции не наблюдается,  
– белок наблюдается во фракции протопластов.

## Определение и анализ новых геномов термофильных архей

Марданов А.В.<sup>1</sup>, Равин Н.В.<sup>1</sup>, Бонч-Осмоловская Е.А.<sup>2</sup>, Скрыбин К.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, 117312, Просп. 60-летия Октября, д.7, корп.1, e-mail: [mardanov@biengi.ac.ru](mailto:mardanov@biengi.ac.ru)

<sup>2</sup> - Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 117312, Просп. 60-летия Октября, д.7, корп.2

Расшифровка геномов микроорганизмов является одной из фундаментальных основ для проведения исследований в области микробиологии, молекулярной биологии и эволюции живых организмов, а также имеет практическое значение для биотехнологии. В частности, определение полной нуклеотидной последовательности геномов термофильных микроорганизмов позволяет идентифицировать новые практически значимые ферменты, имеющие высокую активность и стабильность в условиях повышенной температуры, которые используются в производстве продуктов питания, детергентов, биотехнологии и медицине. Мы определили полные нуклеотидные последовательности геномов двух гипертермофильных архей. Одна из них, креноархея *Desulfurococcus kamchatkensis*, была изолирована из термального горячего источника Кальдеры Узон (Камчатка) имеющего температуру 82°C и pH 6.8. Этот микроорганизм является анаэробом, растущим на широком спектре белковых субстратов, в том числе таких трудно гидролизуемых как альфа-кератина, а также на некоторых сахарах. Второй микроорганизма, эуархея *Thermococcus sibiricus*, был изолирован из высокотемпературного нефтяного резервуара Самотлор в Западной Сибири. *T. sibiricus* является анаэробом, растущим на пептидных субстратах в широком диапазоне температур, от 40 до 88°C. Для определения полных нуклеотидных последовательностей геномов была использована комбинированная стратегия, предполагающая сочетание двух основных на сегодняшний день методов, - «Сэнжеровского» секвенирования и метода параллельного пиросеквенирования на секвенаторе GS FLX (Roche). Геномы *D. kamchatkensis* и *T. sibiricus* представляют собой кольцевые молекулы ДНК длиной 1365223 нт и 1845800 нт, соответственно. Идентифицировано и аннотировано соответственно 1474 и 2084 белок-кодирующих генов, идентифицированы гены рибосомных и транспортных РНК, мобильные элементы. Соответствующие данные будут представлены в докладе. Обнаружены новые гены, кодирующие потенциальные термостабильные протеазы, амилазы, пулулланазы, ДНК-лигазы, полимеразы, альфа и бета-глюкозидазы, которые могут быть использованы в промышленной биотехнологии и молекулярной диагностике.

## Эволюция генно-инженерного инструментария для конструирования бесплазмидных безмаркерных рекомбинантных штаммов *E. coli*

Минаева Н.И.<sup>1</sup>, Гак Е.Р.<sup>1</sup>, Зименков Д.В., Скороходова А.Ю.<sup>2,3</sup>, Бирюкова И.В.<sup>1</sup>,  
Машко С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», 117545  
Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1; e-mail: [Natalia.Minaeva@agri.ru](mailto:Natalia.Minaeva@agri.ru)

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Россия,  
г. Москва, ул. Вавилова, 32; e-mail: [Z@biochip.ru](mailto:Z@biochip.ru)

<sup>3</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов, 117545 Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд,  
д.1; e-mail: [Skorokhodova@genetika.ru](mailto:Skorokhodova@genetika.ru)

Конструирование бесплазмидных и не содержащих маркеров устойчивости к антибиотикам бактериальных штаммов-продуцентов биологически активных веществ является необходимым условием их использования в современном производстве. Как правило, такие штаммы конструируют с помощью последовательных хромосомных модификаций, включающих делеции, замены небольших участков генома и встраивание протяженных фрагментов с новыми генами/оперонами. Для первых двух указанных типов модификаций лучшим способом является разработанная несколькими группами Red/ET-зависимая рекомбинация коротких фрагментов ДНК с бактериальной хромосомой. Для интеграции протяженных фрагментов используют различные системы на основе транспозонов и фага- $\mu$  для инсерций в случайную точку генома, или сайт-специфической рекомбинации бактериофагов ( $\lambda$ ,  $\phi 80$  и др.) для интеграции в соответствующие уникальные участки *attB*.

Авторами предложена новая комбинированная стратегия такого конструирования, использующая достоинства известных систем и обеспечивающая возможность прецизионного дизайна всех планируемых модификаций. Она включает Red-зависимую интеграцию искусственных  $\phi 80$ -*attB* сайтов в желаемые области бактериальной хромосомы с последующими двумя сайт-специфическими рекомбинационными процессами. Первый –  $\phi 80$ -зависимая интеграция в  $\phi 80$ -*attB* целевого фрагмента ДНК в составе условно-репликативной плазмиды, содержащей селективный маркер и  $\phi 80$ -*attP* сайт, и второй – вырезание с помощью  $\lambda$ Int/Xis-системы векторного фрагмента, фланкированного  $\lambda$ *attL/R*-сайтами, из хромосомы.

Используя ген *cat* в качестве модели, экспериментально показано, что разработанная стратегия позволяет эффективно интегрировать протяженные целевые фрагменты ДНК в желаемые точки хромосомы. Можно также, при необходимости, объединять несколько интегрированных кассет в одном штамме с помощью селективного переноса общей трансдукцией их маркированных вариантов в штамм, уже содержащий предварительно «излеченные» от маркера кассеты.

Разработанная стратегия эффективно используется авторами при конструировании штаммов *E. coli* - продуцентов аминокислот.

## Экспрессия и характеристика рекомбинантных миниплазминогена и микроплазминогена человека

Минашкин М.М., Гурский Я.Г., Скрыпина Н.А., Бибилашвили Р.Ш.

*ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий», 121552, Москва, ул. 3я Черепковская, 15-а, [mike@cardio.ru](mailto:mike@cardio.ru)*

Плазмин - сериновая протеаза, выполняющая ряд физиологических функций. Одна из них - растворение фибриновых сгустков. В норме плазмин циркулирует в крови в виде неактивного предшественника плазминогена - гликопротеина с молекулярной массой около 87000 и длиной 791 аминокислотный остаток. Плазмин обладает способностью связываться со свежеформированными сгустками фибрина. В молекуле плазмина выделяют 2 цепи. А-цепь состоит из 5 крингл-доменов, каждый из них имеет в длину 78-80 аминокислотных остатков и стабилизируется 3 дисульфидами. В-цепь состоит из линкерного участка длиной 20 аминокислотных остатков и протеазного домена.

В лабораторных условиях можно получить варианты плазминогена, лишённые крингл-доменов: 1) мини-плазминоген (mPg): состоит из пятого крингла, линкера и протеазного домена. 2) микро-плазминоген ( $\mu$ Pg): состоит только из линкера и протеазного домена. Эти варианты плазминогена активируются по такому же механизму, как и полноразмерный плазминоген.

Мини- и микроплазминоген были нами экспрессированы в *E.coli*. Белки несли на N-конце олигогистидиновую последовательность, что облегчало их дальнейшую очистку с помощью металлохелатной аффинной хроматографии (МХАХ). Рекомбинантные белки суперэкспрессировались в виде телец включения, т.е. в водонерастворимой форме. После лизиса бактериальных клеток осадок, содержащий тельца включения, отмывали и растворяли в денатурирующих условиях. После ренатурации и очистки с помощью МХАХ и ионообменной хроматографии выход мини-плазминогена составил от 3 до 5 мг белка из литра бактериальной культуры, микро-плазминогена - от 8 до 10 мг из литра бактериальной культуры. Гомогенность белка проверялась с помощью электрофореза и составляла не менее 90%.

Была проверена способность этих белков к активации урокиназой, а также специфическая активность полученных вариантов плазмина в отношении к хромогенному субстрату и к проурокиназе. Выяснилось, что протеолитическая активность укороченных вариантов плазмина практически не отличалась от таковой полноразмерного белка. Отличия наблюдались в кинетике активации проурокиназы плазмином и мини-плазмином, в частности, снижение каталитической эффективности у мини-плазмина примерно в 4.5 раза. В отношении низкомолекулярного субстрата кинетика плазмина и мини-плазмина была сходной.

Предполагается, что плазмин будет более пригоден и более безопасен, чем активаторы плазминогена, при растворении протяженных кровяных тромбов у человека. Рекомбинантные мини- и микро-плазминогены могут послужить основой для создания нового тромболитического препарата, обладающего исключительно тромболитической активностью и не дающего, в отличие от полноразмерного плазминогена, других физиологически активных продуктов, например, ангиостатина.

## **Модификация штамма *Saccharomyces cerevisiae*, продуцирующего рекомбинантный сывороточный альбумин человека, путем гиперэкспрессии компонентов секреторного аппарата**

Молчанова Д.В., Козлов Д.Г.

*ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д.1. e-mail: [lab20@genetika.ru](mailto:lab20@genetika.ru)*

Сконструирован модельный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующий синтетический ген сывороточного альбумина человека. На базе этого штамма исследовано влияние гиперэкспрессии отдельных генов секреторного аппарата дрожжей на уровень секреции альбумина. Тестированы гены, контролирующие стадии транслокации, сворачивания и транспорта секретируемых белков. Анализ экспрессии альбумина проводили на богатой среде, при этом и ген альбумина, и гиперэкспрессируемые гены были интегрированы в геном дрожжей. Для большинства генов (12 из 17, включая *SSA1*, *SSA3*, *SEB1*, *SEC61*, *SSS1*, *KAR2*, *SEC4*, *MSB4*, *SEC2*, *SSO2*, *SEC9*, *SEC1*) достоверного влияния на уровень секреции альбумина не обнаружено. Отрицательный эффект (1,7 – 2,5-кратное снижение уровня секреции альбумина) сопровождал гиперэкспрессию генов *YDJ1*, *SAR1*, *ERV29*, *SNC2*, и только для *LHS1* было выявлено 1,5-кратное увеличение продукции альбумина.

## Транскрипционная регуляция генов биосинтеза эктоина у галофильных метилотрофных бактерий

Мустахимов И.И., Решетников А.С., Хмеленина В.Н.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, пр. Науки 5. e-mail: [mii80@rambler.ru](mailto:mii80@rambler.ru)

При росте на среде с повышенной концентрацией NaCl галофильные метилотрофные бактерии синтезируют эктоин (1,4,5,6-тетрагидро-2-метил-4-пиримидин карбоксилат), в качестве основного осмопротектора (Khmelenina et al., 1999, Doronina et al., 2003). Ранее нами была расшифрована полная последовательность генов *ectABC* у метанотрофа *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z и метиловых бактерий *Methylophaga thalassica* и *Methylophaga alcalica*, показано, что гены образуют четырехгенный оперон *ectABCask*. Цель данной работы - изучение регуляции биосинтеза эктоина аэробными гало(алкало)фильными метилотрофными бактериями *Mm. alcaliphilum* 20Z, *M. alcalica*, *M. thalassica* на уровне транскрипции оперона *ectABCask*.

Обнаружено, что *ect*-оперон у данных метилотрофных бактерий в условиях повышенной осмолярности внешней среды транскрибируется с двух промоторов P1 и P2. Тогда как, в условиях низкой осмолярности транскрипция с промотора P1 репрессируется.

Установлено, что выше *ect*-оперона располагается ген *ectR*, кодирующий белок, содержащий НТН мотив (спираль-поворот-спираль), характерный для MarR семейства транскрипционных регуляторов. Клонированием и экспрессией в *E. coli* генов *ectR* из *Mm. alcaliphilum* 20Z и *M. thalassica* получены гомогенные препараты предполагаемых регуляторных белков. Выявлено, что белки EctR метилотрофных бактерий специфически и обратимо связываются с промотором P1 *ect*-оперона, в пределах предполагаемой -10 последовательности. С использованием двух-векторной системы показано, что EctR является транскрипционным репрессором.

Показано, что у метанотрофа *Mm. alcaliphilum* 20Z промоторная область (P<sub>R</sub>) гена регулятора располагается между промоторами P1 и P2 *ect*-оперона. Возможно, транскрипция с промотора P<sub>R</sub> контролируется собственным продуктом - регулятором EctR, т.е. он является ауторегулятором. Напротив, у *M. thalassica* промоторы P<sub>RM1</sub>, P<sub>RM2</sub> и P<sub>RM3</sub> гена регулятора *ectR* не перекрываются с промоторной областью *ect*-оперона, и, по-видимому, отсутствует сайт связывания для белка EctR в промоторной области гена *ectR*.

В последние годы эктоин все более активно используется в биохимических и молекулярно-биологических исследованиях в качестве эффективного стабилизатора ферментов, нуклеиновых кислот и ДНК-белковых комплексов, а также в косметической промышленности как увлажнитель, легко проникающий в клетки и повышающий их тургор. Однако химический синтез эктоина сопряжен с использованием дорогостоящих предшественников (L-аминокислот) и трудоемких процедур очистки продукта. Наши данные о регуляции биосинтеза эктоина создают реальные предпосылки выделения этого биопротектора из новых эффективных штаммов-продуцентов, созданных на основе метилотрофов, путем целенаправленного генно-инженерного конструирования.

Работа поддержана грантами РФФИ: 06-04-49498, 07-04-01064 и 07-04-12053-офи-а

## Влияние микроорганизмов ризосферы на улучшение роста растений в условиях солевого стресса

Мухаметзянова А.Д.<sup>1</sup>, Schnell S.<sup>2</sup>, Шарипова М.Р.<sup>1</sup>, Каюмов А.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный университет им. Ульянова-Ленина, Россия г. Казань 420008 ул. Кремлевская д.18, [Margarita.Sharipova@ksu.ru](mailto:Margarita.Sharipova@ksu.ru)

<sup>2</sup>Justus-Liebig University Institute for Applied Microbiology IFZ Giessen, Germany Giessen D-35392 Heinrich-Buff-Ring 26-32, [sylvia.schnell@agr.uni-giessen.de](mailto:sylvia.schnell@agr.uni-giessen.de)

Микроорганизмы ризосферы высших растений положительно влияют как на рост, так и на жизнедеятельность растений. Вызванный бактериями эффект может быть связан с увеличением доступности лимитированных, но важных для растений питательных веществ. Например, улучшение фосфорного питания достигается путем мобилизации фосфора из нерастворимых неорганических полифосфатов и/или фитатов, которые содержат около 20-50% всего органического фосфора почв.

Цель работы - идентификация микроорганизмов ризосферы *Plantago winteri* и *Hordeum secalinum* – двух типичных галотолерантных растений соленых почв в Германии, и определение способности этих микроорганизмов способствовать росту растений в условиях солевого стресса.

Из образцов почвы ризосферы *Plantago winteri* и *Hordeum secalinum* методом посевов на селективные питательные среды выделили микроорганизмы различных функциональных групп. Наибольший интерес представляли микроорганизмы, обладающие фосфат-мобилизирующей активностью, выделенные на средах СР и ИНР. Изоляты пересеивались по 5-7 раз для получения чистых культур. Затем для выделения гена 16S рРНК проводили Direct PCR. Полученные продукты амплификации анализировали с помощью горизонтального гель электрофореза в 1% агарозном геле.

Идентификация видового состава бактерий проводилась путем анализа генов кодирующих 16S рРНК, для определения последовательности которых было проведено секвенирование. Далее проводили сравнительный анализ последовательностей с использованием алгоритма BLAST и программы MEGA 4.0.

Таким образом, на основе молекулярно-генетических методов анализа установлена видовая принадлежность выделенных бактериальных штаммов: E37 - *Stenotrophomonas maltophilia*, E111 - *Sinorhizobium fredii*, E148 - *Bacillus pumilus*, E129 - *Bartonella* sp. Выделенные бактерии эффективно культивируются на средах СР и ИНР, что дает нам возможность предположить, что данные изоляты продуцируют фермент фитазу, способствующий мобилизации фосфора из нерастворимых фитатов почвы.

Для идентификации и сравнительного анализа генов, кодирующих фитазу проводили анализ геномов бактерий рода *Bacillus*, представленных в базе данных сервера NCBI. Структуры генов фитазы *Bacillus subtilis* и *B. amyloliquefaciens* гомологичны на 100%. А идентичность фитаз *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis* составила 73%.

## Изучение свойств фермента и структурной организации кластера нитрилазы *alcaligenes denitrificans* C32

Новиков А.Д., Рябченко Л.Е., Леонова Т.Е., Залунин И.А., Ревина Л.П., Яненко А.С.

ФГУП "ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов",  
117545, 1-Дорожный пр., 1, Москва; e-mail: [andrnov@genetika.ru](mailto:andrnov@genetika.ru)

Нитрилазы, катализирующие превращение нитрилов в соответствующие кислоты и аммоний, широко используются в современной биотехнологии для получения различных полимерных материалов.

Бактериальный штамм *Alcaligenes denitrificans* C32, способный расти на нитрильных соединениях благодаря наличию нитрилазы, в настоящее время используется в промышленности для получения акриловой кислоты.

Целями настоящей работы являлись выделение и исследование нитрилазы *A. denitrificans* C32, а также клонирование и изучение организации хромосомного локуса, контролирующего синтез фермента в штамме C32.

Выделенная нитрилаза представляет собой двенадцати субъединичный фермент с молекулярной массой одной субъединицы около 43кДа. Температурный оптимум нитрилазы *A. denitrificans* C32 равен 55<sup>0</sup>С. Максимальную активность, исследуемая нитрилаза проявляла в широком диапазоне рН (6,5-11).

Анализ влияния солей показал, что сильным ингибирующим эффектом на нитрилазу *A. denitrificans* C32 обладают анионы хлора и брома.

Константа Михаэлиса фермента была 3,2 – 3,6 mM, молекулярная каталитическая константа 55 - 60 моль/с.

Фермент проявлял активность в отношении широкого спектра субстратов как алифатического, так и ароматического ряда. Наибольшую активность нитрилаза проявляла в отношении акрилонитрила (100%), бутиронитрила (53%) и цианпиридина (52%). Ниже была активность в отношении адипонитрила (38%) и кротонитрила (30%), валеронитрила (25%), метакрилонитрила (20%), бензонитрила (15%) и ацетонитрила (10%). Изобутиронитрил не являлся субстратом для нитрилазы *A. denitrificans* C32.

Секвенирование и структурно функциональный анализ фрагмента хромосомы (~15 т.п.н.), контролирующего утилизацию нитрилов в *A. denitrificans* C32, позволили идентифицировать структурный ген нитрилазы; фрагмент гомологичный (65%) гену карнитинового оперона *CaI E* и фрагмент гомологичный регуляторному гену *AraC* (47%). Структурный ген нитрилазы *A. denitrificans* C32 обнаруживал наибольшую гомологию (85%) с арилацетонитрилазой из *Alcaligenes faecalis* JM3 [GeneBank №BAA02684].

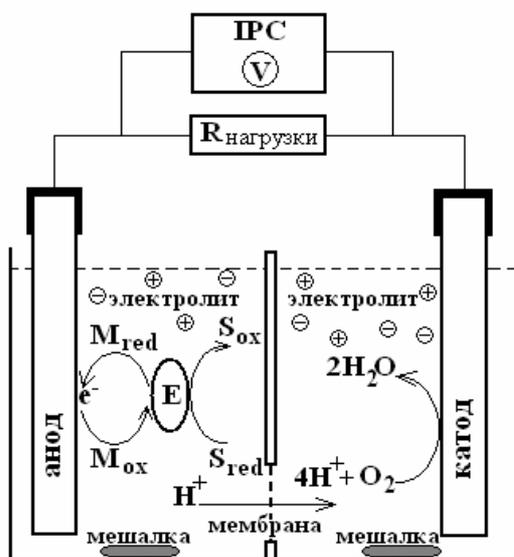
Полученные данные могут быть использованы при создании новых, более эффективных биокатализаторов для использования в полимерной промышленности.

## Использования лакказы в катодном пространстве биотопливного элемента

Носова Н.М., Бут С.Ю.

Тульский государственный университет, 300600, г. Тула, пр. Ленина, д. 92.  
тел. (4872)35-18-40, факс (4872)33-13-05, e-mail: [chem@tsu.tula.ru](mailto:chem@tsu.tula.ru)

Последнее десятилетие отмечено интенсивным изучением в области разработки альтернативных источников электрической энергии - биотопливных элементов (БТЭ). Повысить эффективность работы БТЭ можно, используя медиаторы электронного транспорта в катодном и анодном пространстве. Перспективным направлением является использование иммобилизованных на катоде ферментов для повышения интенсивности электродных процессов в БТЭ.



На основе анализа литературных данных была выбрана модель для изучения влияния типа катода на параметры биотопливного элемента, состоящая из двух ячеек, разделенных мембраной, где в анодном пространстве используется в качестве медиатора 2,6-дихлор-фенолиндофенол (ДХФИФ), а в катодном – гексационоферрат (ГЦФ) или же иммобилизованная на электроде лакказы (Рис.1). Для более эффективного нанесения лакказы на электрод фермент растворяли в смеси цитратного буфера с ацетоном и выдерживали электрод в этом растворе в течение 2 суток при температуре 5°C, а затем высушивали на воздухе.

Рис. 1. Схематическое представление биотопливного элемента.

$S_{red}$ ,  $S_{ox}$  – восстановленный и окисленный субстрат, E – фермент в составе бактериальной клетки,  $M_{red}$  и  $M_{ox}$  – восстановленная и окисленная формы медиатора.

В качестве катодного пространства использовали 3 системы: чистый электрод, погруженный в буфер; электрод с иммобилизованной лакказой; электрод, погруженный в раствор гексационоферрата (III) калия.

Табл. 1. Характеристики БТЭ с использованием различных типов катодов.

Тип катода	$U_{max}$ , мВ	$U_{10\text{pOm}}$ , мВ	$I_{10\text{pOm}}$ , мкА	$P$ , Вт·10 <sup>7</sup>
Чистый катод	313	10	1,0	3,1
Лакказный катод	330	23	2,3	7,6
ГЦФ в катодном пространстве	356	26	2,6	9,3

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что иммобилизация лакказы на катоде позволяет снизить перенапряжение кислорода на этом электроде. Восстановление кислорода на катоде идет более интенсивно, вследствие чего наблюдалось повышение тока по сравнению с системой без лакказы. В тоже время, применение ГЦФ в катодном пространстве позволяет увеличить разность потенциалов. Вероятно, увеличение эффективности электродных процессов зависит от способа модификации поверхности катода лакказой и требует дальнейших исследований.

## **Исследование влияния ассоциации микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти и растений на эффективность очистки модельных систем, загрязненных нефтью**

Овчинникова А.А.<sup>1,2</sup>, Ветрова А.А.<sup>1,2</sup>, Филонов А.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Пуцинский государственный университет, г. Пуцино, Московская Область*

<sup>2</sup> *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН  
г. Пуцино, Московская Область, пр. Науки 5, 142290  
e-mail: [Anastasia\\_777@rambler.ru](mailto:Anastasia_777@rambler.ru)*

В результате промышленной и хозяйственной деятельности человека огромные территории оказались загрязнены различными поллютантами. Одним из наиболее распространенных загрязнителей почвенных и водных экосистем является нефть. Основной вклад в окисление нефти и нефтепродуктов вносят гетеротрофные микроорганизмы, которые способны использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии. Для повышения эффективности процесса биodeградации различных загрязнителей используют растительно-микробные ассоциации.

Процесс фиторемедиации широко используется для очистки загрязненных участков, однако взаимное влияние членов растительно-микробной ассоциации мало изучено.

Целью работы являлась оценка влияния микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти на биометрические характеристики растений и изучение взаимного влияния членов микробно-растительного сообщества в условиях загрязнения модельных систем нефтью.

Были проведены лабораторные эксперименты, в которых оценивались влияние интродуцированных штаммов-деструкторов на степень деградации нефти и на биометрические характеристики растений. Также было изучено взаимное влияние микроорганизмов-деструкторов и растений при совместном использовании в качестве микробно-растительной ассоциации для очистки от нефтезагрязнений в лабораторных и полевых условиях.

## Клонирование и экспрессия генов куриного и свиного лейкоцитарного $\alpha$ -интерферона в клетках бактерий *Escherichia coli*

Потапович М.И., Трубицына М.В., Николайчик Е.А., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, 220030, Беларусь, г. Минск, пр. Независимости, 4, e-mail: [potapovich@bsu.by](mailto:potapovich@bsu.by)

Интерфероны (ИФНы) представляют собой класс гликопротеинов, обладающих антивирусной, антипролиферативной и иммунорегуляторной активностью. Интерфероны используются для лечения и профилактики большого числа заболеваний человека и животных.

Гены куриного и свиного лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона были амплифицированы на матрице тотальной ДНК, выделенной из крови, с использованием сконструированных специфических праймеров, отсекуены и клонированы в вектор экспрессии рЕТ24b(+). Полученными рекомбинантными плазмидами был трансформирован штамм *Escherichia coli* BL21 ( $\lambda$ DE3). После индукции ИПТГ или лактозой наблюдалось накопление в бактериальных клетках большого количества белка, равного по молекулярной массе куриному лейкоцитарному  $\alpha$ -интерферону. В то же время в клетках бактерий, трансформированных рекомбинантной плазмидой, несущей ген свиного  $\alpha$ -интерферона, не наблюдалось накопления соответствующего белка.

Известно, что экспрессия генов эукариот в бактериальных клетках зависит от различных факторов, и в первую очередь от нуклеотидной последовательности клонированного гена. Различие в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот может являться одной из причин отсутствия или недостаточно высокого уровня экспрессии гетерологичных генов в прокариотических клетках. Проведенный анализ показал, что в структурной части гена куриного лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона имеется шесть, а составе свиного – девятнадцать редко встречающихся в *E. coli* аминокислотных кодонов, что может являться причиной отсутствия экспрессии свиного лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона в клетках *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3).

Для оценки влияния на экспрессию гетерологичного гена различия в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот нами была проведена трансформация штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащего амплифицированные копии генов редких т-РНК, рекомбинантными плазмидами рЕТ24b(+), несущими гены куриного и свиного лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона. Результаты показали, что после индукции в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL происходит значительное накопление белка, соответствующего по размеру свиному лейкоцитарному  $\alpha$ -интерферону. Кроме того, образование существенно большего количества белка, соответствующего по размеру куриному лейкоцитарному  $\alpha$ -интерферону, происходит в клетках штамма, содержащего амплифицированные копии генов редких т-РНК.

## Регуляция транскрипции рН-индуцируемого гена *ugjT* *Escherichia coli*

Прошкин С.А., Чернятина А.А., Миронов А.С.

ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д.1, e-mail: [sproshkin@rbcmail.ru](mailto:sproshkin@rbcmail.ru)

*Escherichia coli* способна расти в среде с широким диапазоном рН (рН5-9), при этом поддерживая постоянным нейтральное значение рН 7.4-7.8 внутри клетки. Для быстрой адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды бактерия нуждается в тонкой регуляции генной экспрессии. Ранее было обнаружено, что в ответ на щелочные условия инкубации клеток, происходит усиление экспрессии гена *ugjT E.coli*, кодирующего потенциальный трансмембранный белок. На основе первичной структуры этого гена в промоторной области мы обнаружили нуклеотидную последовательность, совпадающую с консенсусной последовательностью для связывания фактора СрхR, а также два р-независимых терминатора транскрипции в 5'-нетранслируемой области.

Белок СрхR является частью двухкомпонентной системы СрхR/A защиты клетки при периплазматическом стрессе. Для экспериментальной проверки действия СрхR в регуляции транскрипции гена *ugjT* мы суперпродуцировали этот белок в *E.coli* и выделили его. Реконструировав транскрипцию *ugjT* в очищенной системе *in vitro*, мы продемонстрировали, что фосфорилированный СрхR может выступать в роли активатора транскрипции. С помощью метода торможения в геле выяснили, что СрхR связывается с проксимальной частью гена *ugjT*, причем только в фосфорилированной форме. Сайт связывания этого фактора с промотором *ugjT* мы экспериментально локализовали на футпринте. Мы также изучили регуляцию транскрипции данного гена *in vivo*. С помощью ОТ-ПЦР детектировали накопление РНК, кодируемых геном *ugjT*, в клетках *E. coli* дикого типа и мутанта с инактивированным локусом СрхR при рН 6.5 и 8.7 и показали, что активация транскрипции *ugjT* происходит только в штамме дикого типа в щелочных условиях.

Для изучения влияния промотора *ugjT* на активацию транскрипции гена и антитерминацию в 5'-некодируемой области мы сконструировали транскрипционный фьюз лидерной области *ugjT* с маркерным геном *lacZ*, заменив при этом промотор *ugjT* на промотор *hisR*. Уровень экспрессии *ugjT* в различных физиологических условиях определяли путем измерения активности β-галактозидазы. В результате выяснили, что антитерминация в проксимальной части гена *ugjT* происходит при росте клеток в щелочной среде и не зависит от структуры промотора. Увеличение экспрессии *ugjT* при рН 8.7 происходит, по-видимому, главным образом за счет активации инициации транскрипции с помощью СрхR.

## Лактофаг БИМ БV-37 семейства *Podoviridae*

Райский А.П.<sup>1</sup>, Белясова Н.А.<sup>1</sup>, Лагоненко А.Л.<sup>2</sup>, Евтушенков А.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет, 220006 Минск, Сведлова, 13а. e-mail: [bt00-05@rambler.ru](mailto:bt00-05@rambler.ru)

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, 220030 Беларусь, г. Минск, Пр. Независимости 4

Фаги бактерий рода *Lactococcus lactis* представляют собой достаточно хорошо изученную группу микроорганизмов. На текущий момент известны последовательности нуклеотидов геномов 22 фагов лактококков. Интерес к этим объектам обусловлен, в первую очередь, тем, что фаголизис на предприятиях является одной из основных проблем при производстве широкого спектра ферментированных молочных продуктов. На данный момент фаги бактерий *Lactococcus lactis* дифференцируют на 10 групп, три из которых (с2, P335 и 936) распространены повсеместно и наиболее часто упоминаются в качестве возбудителей фаголизиса на молочных комбинатах России, Европы, Америки и других регионов [1]. Лактофаги упомянутых групп являются представителями семейства *Siphoviridae*, а их вирионы содержат длинный (90-130 нм) несократимый отросток.

Широкомасштабный фаговый мониторинг, проведенный на территории Республики Беларусь, позволил выявить необычно высокую пропорцию (до 17%) бактериофагов с коротким (18–20 нм) хвостовым отростком, которые, согласно морфологическим критериям [2], должны принадлежать к семейству *Podoviridae*. Для их идентификации использовали метод мультиплексной ПЦР с известными праймерами, специфичными ДНК лактофагов с2, P335 и 936. Показано отсутствие искомым фрагментов ДНК в геномах всех четырех изученных изолятов. Предположительно, исследованные лактофаги относятся к группе P034.

Один из фагов данной группы (БИМ БV-37, рисунок) отличался от всех остальных изолятов спектром продуктов рестрикции эндонуклеазами *EcoRV* и *HindIII*, составом белков капсида, а также степенью устойчивости к разным инактивирующим агентам. В коллекции бактерий *Lactococcus lactis* найдено 3



штамма, клетки которых обеспечивали его репродукцию. Четыре фрагмента ДНК фага БИМ БV-37 были клонированы в составе плазмидного вектора (pUC18) и секвенированы. Сравнение последовательностей нуклеотидов клонированных фрагментов общей протяженностью (1600 п.н.) с геномами изученных лактофагов в BLAST 2.2.18+ выявило низкую степень гомологии. Полученные данные позволяют надеяться, что БИМ БV-37 является новым, пока не описанным в литературе фагом.

### Литература:

1. Deveau H., Labrie S. J., Chopin M. C., Moineau S. (2006) Biodiversity and classification of lactococcal phages. – *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4338–4346.

2. Jarvis A.W., Fitzgerald G. F., Mata M., Mercenier A., Neve H., Powell I. B., Ronda C., Saxelin M., Teuber M. (1991) Species and type phages of lactococcal bacteriophages. – *Intervirology*, 32, 2–9.

## Синтез 4-гидроксиизолейцина на основе сопряжения ферментативных активностей альдолазы и аминотрансферазы: теоретические и практические аспекты

Рушкевич Н.Ю., Котлярова В.А., Самсонова Н.Н., Смирнов С.В.

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ») 117545, Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д.1  
e-mail: [icewind\\_dale@bk.ru](mailto:icewind_dale@bk.ru)

(2S, 3R, 4S) - 4-гидроксиизолейцин (4НП) является биогенной аминокислотой, обладающей ярко выраженной инсулинотропной активностью. 4НП усиливает (потенцирует) секрецию инсулина в ответ на увеличение концентрации глюкозы в крови человека. В отличие от множества современных химических лекарственных препаратов, действие 4НП строго пропорционально концентрации глюкозы. Это позволяет регулярно использовать 4НП в качестве пищевой добавки, не опасаясь возникновения состояния гипогликемии. Таким образом, 4НП представляет собой весьма перспективное средство для терапии и профилактики диабета II типа.

Ранее, авторами была показана принципиальная возможность стереоспецифического синтеза 4НП из ацетальдегида,  $\alpha$ -кетобутирата и L-глутамата на основе сопряжения ферментативных активностей альдолазы (HPAL) и аминотрансферазы разветвленных аминокислот (BCAT, EC 2.6.1.42). Предложенная схема синтеза 4НП включала две ферментативные стадии: 1 - альдольную конденсацию ацетальдегида и  $\alpha$ -кетобутирата с образованием 4-гидрокси-3-метил-2-кетопентановой кислоты (НМКР), 2 - аминирование НМКР, с использованием L-глутамата в качестве донора аминогруппы [Smirnov *et al.* // FEMS Microbiol Lett. - 2007. № 273(1). - С. 70-77].

В данной работе проведен термодинамический анализ предложенной схемы синтеза 4НП. Показано, что максимальный теоретический выход продукта может быть достигнут только при использовании  $\alpha$ -аминобутирата в качестве донора аминогруппы. В этом случае, с формальной точки зрения, двух-стадийный процесс эквивалентен прямой реакции конденсации ацетальдегида и  $\alpha$ -аминобутирата с образованием 4НП.

На основании полученных результатов, предложена новая принципиальная схема биосинтеза 4НП с использованием биомасс двух специально сконструированных штаммов *E. coli* - I и II. На первом этапе, с помощью биомассы штамма I, происходит биоконверсия треонина в смесь  $\alpha$ -аминобутирата и L-глутамата. На втором этапе, с помощью биомассы штамма II, полученная смесь в присутствии ацетальдегида конвертируется в 4НП.

## Детекция ряда карантинных фитопатогенов методом ПЦР в формате FLASH

Рязанцев Д.Ю.<sup>1</sup>, Абрамов Д.Д.<sup>2</sup>, Завриев С.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117977, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10,  
e-mail: [ryadi@mail.ru](mailto:ryadi@mail.ru);

<sup>2</sup> ЗАО «НПФ ДНК-Технология», 115582 Москва, Каширское шоссе, д. 23, к. 5

Для повышения эффективности мер по охране сельскохозяйственного растениеводства и продукции растительного происхождения от патогенных объектов, карантинных на территории РФ, необходимы быстрые, высокочувствительные и надежные методы детекции и идентификации возбудителей болезней растений и вредителей. Применяемые визуальные методы диагностики малоэффективны, а иммуноферментный анализ (доступный для некоторых бактериальных и вирусных патогенов) не всегда обладает необходимой чувствительностью и специфичностью. Одним из современных и перспективных методов диагностики патогенов является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Классическая ПЦР, в которой результаты анализируются методом геле-электрофореза, неудобна в использовании и может привести к контаминации рабочей зоны ампликонами. Исползованный в работе ПЦР в формате FLASH позволяет проводить детекцию результатов реакции в флуоресцентном детекторе, не открывая пробирок, не требуя дорогого оборудования, как метод ПЦР в реальном времени. При этом отсутствует риск контаминации и снижается время детекции. Для контроля достоверности анализов в систему введен внутренний контроль (ВК). При этом в мультиплексной ПЦР происходит одновременная амплификация и детекция фрагмента генома ДНК патогена и ДНК ВК. При использовании готовых наборов этот формат позволяет проводить рутинную диагностику, получать стабильные и точные результаты и не требует высококвалифицированных специалистов.

Нами разработаны простые и эффективные диагностические системы в формате FLASH-ПЦР для следующих карантинных на территории РФ организмов: возбудителя бактериального ожога плодовых (*Erwinia amylovora*), возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum*), вируса шарки сливы (Plum Pox virus), бледной и золотистой картофельных цистообразующих нематод (*Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis*), сосновых стволовых нематод (*Bursaphelenchus mucronatus* и *Bursaphelenchus xylophilus*) и возбудителя ризомании сахарной свеклы (Beet necrotic yellow vein virus - карантинный объект на территории Украины).

Для подбора праймеров отбирались последовательности, консервативные внутри детектируемых видов, но при этом наиболее переменные между видами. Определение видов нематод и бактерий основано на амплификации фрагмента рибосомальной ДНК, включающей переменные внутренние транскрибируемые спейсеры (ВТС 1 и 2) и расположенную между ними консервативную 5.8S рибосомальную РНК. В области ВТС1 и ВТС2 подобраны специфические праймеры, тогда как зонд подбирался к консервативному участку 5.8S РНК. Праймеры на вирусы подбирали к генам белка оболочки.

Разработанные системы апробированы Всероссийским НИИ Карантина Растений и на фирме HLB (Нидерланды).

## Новые аспекты деградации салицилата у флуоресцирующих псевдомонад

Сазонова О.И.<sup>1,2</sup>, Измалкова Т.Ю.<sup>1</sup>, Кошелева И.А.<sup>1,2</sup>, Боронин А.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, 5.

<sup>2</sup>Пушинский государственный университет, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, 3.

e-mail: [sazonova\\_oi@rambler.ru](mailto:sazonova_oi@rambler.ru)

Салицилат является широко распространенным в природе соединением, ключевым интермедиатом в путях микробной деградации различных ароматических углеводов, сам может быть использован микроорганизмами в качестве ростового субстрата, а также играет важную роль в регуляции экспрессии некоторых бактериальных генов. В большинстве случаев бактерии рода *Pseudomonas* трансформируют салицилат в катехол при участии салицилат гидроксилазы с дальнейшей деградацией по *орто*- или *мета*-пути. Генетический контроль утилизации салицилата по *мета*-пути детально изучен на примере *nah2*-оперона плазмиды NAH7 штамма *P. putida* G7. Данная работа посвящена исследованию генов деградации салицилата, отличных от архетипа плазмиды NAH7 у штаммов флуоресцирующих псевдомонад.

В представляемой работе проведен анализ генетических систем катаболизма салицилата у двенадцати штаммов *Pseudomonas putida*, изолированных методом накопительных культур из образцов загрязненных почв Мурманской и Тульской областей. Видовую принадлежность микроорганизмов определяли на основании данных рестрикционного анализа продуктов амплификации гена 16S рРНК. Показано, что все исследованные штаммы не содержат ни гена «классической» салицилат гидроксилазы *nahG*, ни другого «маркерного» гена *nah2*-оперона - гена ключевого фермента *мета*-пути расщепления катехола, катехол-2,3-диоксигеназы (*nahH*). Результаты анализа удельных активностей ферментов подтвердили, что утилизация салицилата происходит по *орто*-пути расщепления катехола, не задействуя *мета*-путь. У всех исследованных штаммов *P. putida* деградация салицилата, предположительно, осуществляется при участии гена салицилат гидроксилазы аналогичного обособленно расположенному от *nah2*-оперона гену *nahU* штамма *P. putida* ND6. У семи штаммов также была обнаружена последовательность «КТ-подобного» гена салицилат гидроксилазы (*nahG1*), которая, вероятно, как и в исходном штамме *P. putida* КТ2440, является псевдогеном. Было установлено, что исследованные штаммы содержат два варианта последовательностей генов салицилат гидроксилазы *nahU*: ND6 и g20f. Вариант гена *nahU* g20f обнаружен впервые. Выдвинуто предположение, что подобные последовательности, не являющиеся частью катаболических оперонов, перемещаясь и включаясь в метаболическую цепь штамма - хозяина, расширяют спектр утилизируемых субстратов и тем самым способствуют адаптации микроорганизмов к условиям окружающей среды.

## Разработка научных основ для создания методов ремедиации загрязненных органофосфонатами почв с помощью микробных препаратов

Свиридов А.В., Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., Леонтьевский А.А.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,  
142290 г. Пушкино, пр-т Науки 5. e-mail: [alhummen@rambler.ru](mailto:alhummen@rambler.ru)*

Органофосфонаты (ОФ) — вещества, имеющие в своем составе прямую углерод-фосфорную связь — являются распространенными почвенными поллютантами, устойчивыми к различным физико-химическим факторам воздействия, но подверженные деструкции с участием ферментных систем некоторых микроорганизмов. К числу опасных органофосфонатов-загрязнителей относятся метилфосфоновая кислота (МФК), продукт детоксикации боевых отравляющих веществ, и глифосат (ГФ) — действующее вещество в составе широко применяемых гербицидов. Актуальна проблема поиска и изоляции штаммов микроорганизмов, способных к эффективному разложению органофосфонатов до нетоксичных продуктов.

Из почв, загрязненных ОФ, был выделен ряд штаммов микроорганизмов-деструкторов этих соединений. Отобраны два штамма, обладающих наибольшей биодеструктивной способностью. У штамма *Achromobacter sp.* MPS12, выделенного из сайтов загрязнения МФК и первоначально не росшего на средах с ГФ, показано наличие фермента С-Р-лиазы, разлагающего МФК до метана и ортофосфата. После адаптации этого штамма к росту на средах с ГФ, деградация данного органофосфоната шла по С-Р-лиазному пути с образованием саркозина и ортофосфата, причем С-Р-лиазная активность в отношении МФК осталась практически неизменной. Таким образом, впервые показано наличие двух независимых С-Р-лиазных систем с разной субстратной специфичностью у одного и того же штамма микроорганизмов. MPS12 признан перспективным для создания биопрепарата, активного в отношении широкого спектра ОФ, как с активированной (ГФ), так и с неактивированной (МФК) углерод-фосфорной связью.

У штамма, выделенного из почв, загрязненных ГФ (*Ochrobactrum anthropii* GPK3), также была обнаружена С-Р-лиаза, способная к разложению МФК, хотя и менее активная, чем у MPS12. Было показано, что разложение ГФ у этого штамма идет не по С-Р-лиазному, а по глифосат-оксидоредуктазному пути, с образованием аминометилфосфоновой кислоты (АМФК) и глиоксилата в качестве интермедиатов. ГФ-оксидоредуктаза была впервые выделена в гомогенном состоянии и охарактеризована: определены ММ, основные кинетические характеристики (К<sub>м</sub>, V<sub>м</sub>, оптимумы рН и температуры), выявлены кофакторы. Разработаны методы адаптации и селекции изученных микроорганизмов, позволяющие повысить экспрессию ферментов первичной атаки ГФ. Также на примере GPK3 впервые показана способность бактерий к росту на средах с ГФ в концентрации свыше 10 г/л при эффективной минерализации данного органофосфоната до ортофосфата и углекислоты.

Результаты исследований являются основой для разработки биопрепаратов, способных к эффективной и быстрой ремедиации почв, загрязненных как гербицидами (ГФ и др.), так и продуктами утилизации химического оружия (МФК), и эти разработки тем более важны, так как в настоящее время отработанных технологий такого рода не существует.

## Влияние дрожжевого экстракта на метаболизм цитрата в *Lactococcus lactis*

Серебренников В.М., Анорова Л.Н., Воронина Л.Н., Глазунов А.В.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов, 117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1,  
e-mail: [glasunov@genetika.ru](mailto:glasunov@genetika.ru)

Продолжены исследования периодической культуры природного мутанта *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, лишенного ацетолактатдекарбоксилазы и накапливающего вследствие этого заметные количества  $\alpha$ -ацетолактата ( $\alpha$ -АЛ).  $\alpha$ -АЛ - один из минорных продуктов брожения, предшественник диацетила, отвечающего за характерный сливочный аромат молочнокислых продуктов. Поскольку глюкозный пируват, продукт гликолиза, переводится клеткой в основном в лактат, доля пирувата, поступающего на синтез минорных продуктов, крайне мала. Некоторое избыточное «напряжение» по пирувату можно создать добавлением в среду цитрата, который легко превращается клеткой в пируват. Благодаря этому «лишнему» пирувату, происходит некоторое усиление синтеза минорных продуктов, в том числе и  $\alpha$ -АЛ.

Ранее было показано, что на глюкозной среде с пептоном и дрожжевым экстрактом (ДЭ)  $\alpha$ -АЛ синтезируется только при аэрации в фазе линейного роста с выходом из глюкозы не более 3-6 %. При совместном метаболизме глюкозы и цитрата превращение обоих субстратов происходило независимо, при этом активная конверсия цитрата через пируват в  $\alpha$ -АЛ наблюдалась только в области рН 5,6-5,9 и составляла около 65 %. Получены новые данные, показывающие, что ДЭ существенным образом влияет на распределение потока цитратного пирувата между лактатом и  $\alpha$ -АЛ. Без ДЭ синтез  $\alpha$ -АЛ на среде с цитратом инициировался при всех приемлемых для роста культуры значениях рН среды от 5,6 до 7,0 с высокой степенью конверсии (до 95%) и протекал в две стадии: сначала из цитрата, затем достаточно интенсивно из глюкозы. На контрольной среде без цитрата синтез  $\alpha$ -АЛ из глюкозы отсутствовал или был минимальным, но в зоне слабокислых значений рН (5,6-5,8) в четверти случаев воспроизводился эксперимент, показывающий всплеск синтеза глюкозного  $\alpha$ -АЛ, очевидно в результате перераспределения потока пирувата от лактата в сторону  $\alpha$ -АЛ.

Полученные данные позволяют предположить, что ДЭ каким-то образом оказывает сильное воздействие на систему регуляции гликолиза в *Lactococcus lactis*.

## Селекция и изучение биологических свойств кислотоустойчивого штамма бифидобактерий

Сидоренко А.В., Новик Г.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, 220141, Минск, Беларусь,  
e-mail: [nastyasid.vbc@mail.ru](mailto:nastyasid.vbc@mail.ru)*

Важным требованием, предъявляемым к производственным штаммам бифидобактерий, является устойчивость к действию стрессовых факторов, в частности, экстремально низких рН.

Методом адаптивной селекции по признаку кислотоустойчивости на основе известного штамма бифидобактерий, используемого при производстве пробиотических препаратов и диетических продуктов питания, был получен штамм, отличающийся высокой устойчивостью к кислотному стрессу. Количество жизнеспособных клеток кислотоустойчивого штамма достоверно не изменялось в течение 180 мин инкубации при рН 2.0, в то время как для исходного штамма отмечалось снижение титра клеток на 3-4 порядка. При глубинном культивировании кислотоустойчивого штамма в среде MRS-C максимальное накопление биомассы (ОП<sub>600</sub>~2.5) и жизнеспособных клеток (~2-5x10<sup>9</sup> КОЕ/мл) происходило через 18-24 часа, при показателе активной кислотности 3.8-3.9 ед. рН. При внесении 3% инокулята, штамм сквашивал стерильное молоко 1.5% жирности через 12 часов культивирования с образованием плотного сгустка однородной консистенции без отделения сыворотки. Показатели активной кислотности и титра клеток на момент образования сгустка составляли 3.9-4.1 ед. рН и 3-5x10<sup>8</sup> КОЕ/мл соответственно. При хранении в холодильнике при +4<sup>0</sup>С количество жизнеспособных клеток бифидобактерий в сквашенном молоке оставалось стабильным в течение 12 суток (время эксперимента). Кислотоустойчивый штамм ферментировал глюкозу, лактозу, мальтозу, ксилозу, сахарозу и арабинозу (медленно), не сбразивал маннит и сорбит. При сравнении показателей активности роста и кислотообразования в питательных средах и молоке, способности к ферментации углеводов, полученных для исходного и кислотоустойчивого штаммов, достоверных различий выявлено не было. Кислотоустойчивый штамм проявлял высокую антагонистическую активность по отношению к штаммам *Enterobacter sp.* БИМ В-246, *Pseudomonas aeruginosa* БИМ В-157, *Escherichia coli* БИМ В-378, *Bacillus subtilis* БИМ В-25 (зона подавления роста 3-5 мм), не ингибировал развития *E. coli* БИМ В-237 и *Lactobacillus plantarum* БИМ В-447. Анализ полученных данных показал, что кислотоустойчивый штамм характеризовался более высоким уровнем антагонистической активности по отношению к культурам *B. subtilis* БИМ В-25 и *P. aeruginosa* БИМ В-157. Видимых морфологических отличий между исходным и кислотоустойчивым штаммами обнаружено не было: бифидобактерии представляли собой грам-положительные прямые или слегка изогнутые палочки, иногда с булавовидными утолщениями на концах. Расположение клеток одиночное, V- или Y-образное, реже в коротких цепочках.

Таким образом, новый штамм бифидобактерий, полученный методом адаптивной селекции, отличается от исходного штамма высокой устойчивостью к действию экстремально низких рН, и является перспективным штаммом для использования при производстве пробиотических препаратов и диетических продуктов питания.

## Плазмидная трансформация клеток *Escherichia coli* с использованием их естественной компетентности

Сидорук К.В.,<sup>1</sup> Романенков Д.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1. e-mail: [k\\_sidoruk@mail.ru](mailto:k_sidoruk@mail.ru)

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»)  
117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1.

e-mail: [dmitryi\\_romanenkov@agri.ru](mailto:dmitryi_romanenkov@agri.ru)

Метод основан на использовании свойства природной компетентности, которым в различной степени обладают многие штаммы *E. coli*. Явление природной трансформации кишечной палочки известно давно (Baur *et al.* 1996), но до настоящего времени оно не находило практического применения в виде простого метода генетической трансформации. Видимо, это связано с тем, что предлагаемые процедуры оставались слишком трудоемкими (Tsen *et al.* 2002), что при относительно низкой частоте природной трансформации делало их малопривлекательными.

Мы предлагаем очень простой метод перетрансформации плазмид, который не требует использования специальных сред и реактивов, не нуждается в процедуре теплового шока и при этом обеспечивает частоту трансформации, достаточную для введения плазмид в клетки *E. coli*. Он полезен в тех случаях, когда необходимо трансформировать плазмиду для дальнейшего выделения.

Для того, чтобы провести трансформацию необходимо посеять клетки *E. coli* петлей или шпателем на стандартную агаризованную среду LB, поместить в термостат на +37<sup>0</sup>С на 16-18 ч., затем нанести на поверхность сплошного газона 2 мкл раствора ДНК, содержащего 0,1 – 1,0 мкг плазмиды, сразу же поместить чашки обратно в термостат на 1 ч., собрать петлей клетки из того участка газона, на который был нанесен раствор плазмиды и пересеять его на чашку с селективной средой. Таким образом, одной чашки с компетентной культурой достаточно для постановки нескольких десятков опытов по трансформации. Если использованную чашку хранить при +4<sup>0</sup>С, то восприимчивость клеток к плазмидной ДНК сохраняется еще как минимум двое суток.

Определены частоты естественной трансформации для нескольких штаммов *E. coli*. Штаммы XL1 Blue и SURE 2 дали наилучшие результаты – 10<sup>2</sup> трансформантов на 1 мкг ДНК pBR322. Они также пригодны для трансформации крупных плазмид, размером до 12 т.п.н. Эти штаммы мы рекомендуем для рутинного использования. Замена в среде LB NaCl (10 г) тем же количеством MgCl<sub>2</sub>х6H<sub>2</sub>O может в 2 - 4 раза увеличить количество трансформантов. Штамм С600 показал неудовлетворительный результат - <10 трансформантов на 1 мкг ДНК pBR322. Штамм BL21(DE3) трансформировать не удалось.

Проведено сравнение эффективности трансформации трех субклонов штамма TG1, которые на протяжении многих лет независимо поддерживались в различных лабораториях. Результаты оказались неожиданными. Три субклона одного штамма стабильно показывали разную степень компетентности – от 10 до 10<sup>3</sup> трансформантов на 1 мкг ДНК pBR322. Высокая вариабельность признака открывает возможности для изучения генетического контроля эффективности естественной трансформации *E. coli* и для создания в дальнейшем специальных штаммов, обладающих высоким уровнем природной компетентности.

## Анализ дифференциальной экспрессии генов в двух штаммах *Mycobacterium tuberculosis*

Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л., Свердлов Е.Д.

Институт Биоорганической Химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, тел.: (495)-330-65-47, факс: (495)-330-6538  
e-mail: [timofey@humgen.siobc.ras.ru](mailto:timofey@humgen.siobc.ras.ru)

Туберкулёз – опасное заболевание бактериальной этиологии, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis*, приводит к смерти около 2-х миллионов человек в год. Различные штаммы этой бактерии отличаются степенью вирулентности и патогенности, а также клиническими проявлениями вызываемого заболевания. Сравнительный анализ транскриптомов штаммов с различной вирулентностью позволяет выявить дифференциально экспрессирующиеся гены, потенциально являющиеся факторами вирулентности.

Мы адаптировали метод супрессионной вычитающей гибридизации для сравнения бактериальных транскриптомов и с помощью этого метода провели сравнительный анализ транскриптомов двух штаммов *M. tuberculosis*: 1462, высоковирулентного клинического изолята, и H37Rv, эталонного лабораторного штамма. В результате эксперимента был найден ряд генов с повышенным уровнем экспрессии в клетках штамма 1462. Для генов *mce2D*, *papA3*, *PPE20*, *pks9-pks11*, *fadD28*, *esxN*, *Rv2030c*, *Rv2627c*, *ppsB*, *Rv3131*, *toaA1* дифференциальность экспрессии была подтверждена при помощи методов ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени. Поскольку большинство этих генов является доказанными или кандидатными факторами вирулентности, их повышенная экспрессия, по-видимому, обуславливает проявление штаммом 1462 более вирулентных свойств по сравнению с лабораторным штаммом H37Rv.

## **Новые биотехнологические подходы к моделированию сложных фоточувствительных биосистем**

Складнев Д.А.

*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Москва 117545, 1-й Дорожный пр., д. 1.  
e-mail: [skladda@gmail.com](mailto:skladda@gmail.com)*

Первая на Земле фотобиосистема обеспечивала жизнедеятельность предков современных галобактерий в докембрийский период 3,6-3,4 млрд. лет назад, когда парциальное давление кислорода в окружающей среде было ещё крайне мало. Основой данной системы является бактериородопсин (БР), трансмембранный ретиналь-содержащий семи- $\alpha$ -спиральный белок (7-ТМ). БР обладает свойствами светозависимого протонного насоса, который обеспечивает образование электрохимического градиента протонов на клеточной мембране, что, в свою очередь, служит для аккумуляции энергии путём синтеза АТФ. Фоточувствительные биосистемы, основанные на ретиналь-содержащих 7-ТМ белках, широко распространены у современных представителей практически всех больших таксономических групп живых организмов. В современной литературе появляется всё больше сообщений об обнаружении новых и новых носителей таких белков, либо об обнаружении геномов, содержащих соответствующие структурные гены. Разумеется, в каждом виде обнаруживаются некоторые структурные различия, но общий принцип работы данной фотобиосистемы остаётся неизменным, что ярко свидетельствует о её биологическом и функциональном совершенстве. Накопленные знания особенностей фотобиосистемы БР давно привлекают к ней внимание исследователей, работающих в самых разных областях естествознания и техники. Мы остановимся на рассмотрении только одного из новейших направлений использования фотобиосистемы современных галобактерий – на моделировании фоточувствительной системы сетчатки глаза.

Изучение фоточувствительной системы сетчатки глаза (как и история офтальмологии) богата открытиями, способами лечения различных заболеваний и постоянно пополняется новейшими разработками, в том числе – приборными. Именно миниатюризация электронных и оптических приборов позволила пару десятилетий назад поставить вопрос о создании искусственного глаза. Сегодня данное направление не рассматривается как самоцель, а, скорее, как один из векторов исследований, направленных на детальное постижение тонких механизмов функционирования самой сложной и вместе с тем самой совершенной фотобиосистемы, являющейся, как известно, участком мозга.

Новые биотехнологические решения предоставляют новые возможности для развития сравнительного изучения ключевых элементов самой древней на Земле (БР) и самой сложной фотобиосистемы (сетчатка).

Разработанный нами оригинальный методический подход позволяет выделять пурпурные мембраны галобактерий в том природном виде и состоянии, в котором они формируются в толще липидного бислоя клеточных мембран галобактерий.

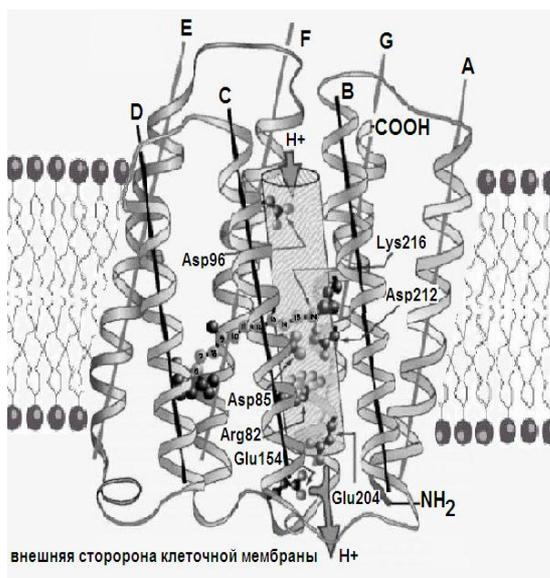


Рис. 1

Конструкция фотозависимых 7-ТМ белков включает хромофорную «антенну» каротиноидной природы, ковалентно связанную с белковой основой посредством Шиффова основания (Рис.1). Белок обычно имеет молекулярный вес 25-40кДа, N-конец обращен на внешнюю сторону мембраны, С-конец - внутрь клетки. Семь  $\alpha$ -спи-ралей (обозначааемых А...G или 1...7) формируют в центральной части гидрофильный колодец с несколькими молекулами воды. Функционально активны только кристаллические структуры фотосистем, объединяющие значительное количество полимеров отдельных 7-ТМ белковых молекул (Рис.2).

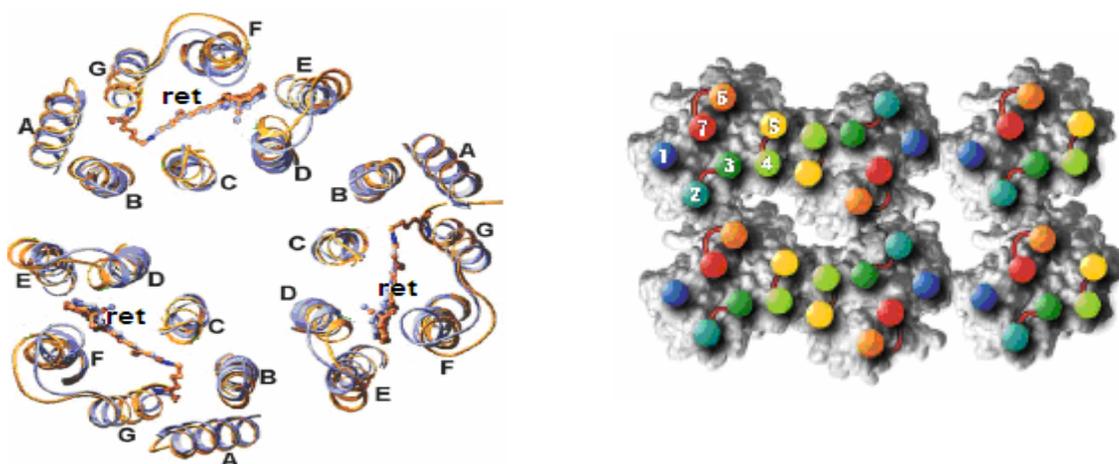


Рис. 2

Фоточувствительной хромофорной частью молекулы **БР** является протонированный альдимин *all-trans* ретиналя. Ретиналь присоединён к аминокислотному остатку лизина (Lys216), локализованному на внутренней поверхности  $\alpha$ -спирали G. В фотосистеме сетчатки глаза в четырёх типах зрительных клеток (палочки и три типа колбочек в соотношении 17:1) содержатся четыре типа очень близких по строению 7-ТМ белков – **родопсинов**. Каждый из этих белков выполняет функции фотозависимой протон-транспортной системы в мембранах оптических дисков своих клеток (Рис.3). Основными отличиями родопсинов сетчатки можно считать различия в спектрах поглощения:  $\lambda$  420, 498\*, 534, 564 нм. Родопсины сетчатки содержат 11-*cis* ретиналь. Различия спектральных характеристик объясняются тем, что отличаются аминокислотные последовательности белковых цепей, наиболее тесно окружающие ретиналь (Рис.3). Соответственно, электронные плотности молекулы ретиналя испытывают различающиеся воздействия, изменяющие спектральные характеристики родопсинов в целом. Такая «четырёхканальная настройка» фотобиосистемы сетчатки обеспечивает нам цветное зрение.

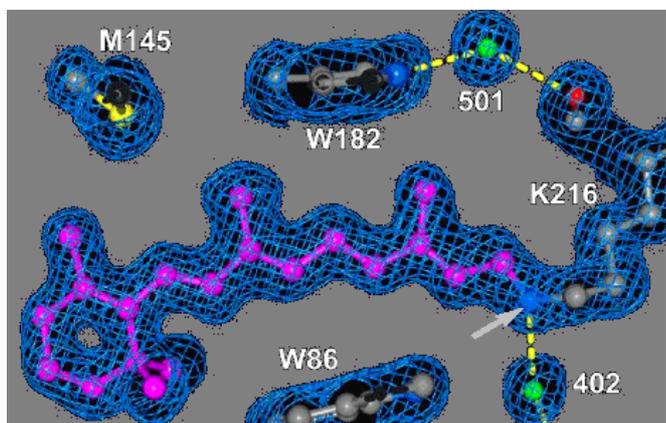


Рис. 3

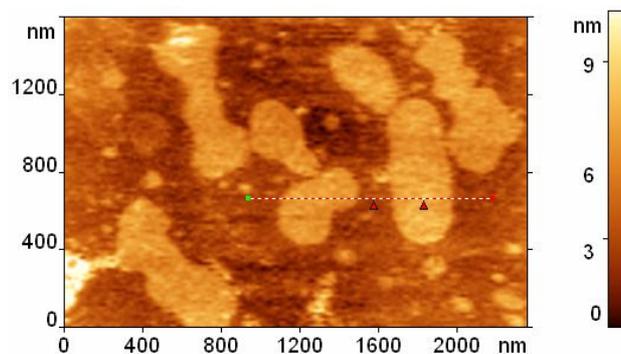


Рис. 4

В случае БР мутанты с изменённым ближайшим аминокислотным окружением ретиналя также отличаются изменёнными спектрами поглощения. Использование пурпурных мембран из клеток таких мутантных штаммов позволит получать искусственные фоточувствительные ОППМ, со спектральными характеристиками, близкими к характеристикам сенсорного слоя сетчатки глаза. С помощью АСМ показано, что получаемые ОППМ имеют высокое содержание бактериородопсина, присутствующего в виде бляшек ПМ (Рис.4).

Работа выполняется при поддержке РФФИ в рамках проекта № 08-07-00276.

## Получение чГ-КСФ в растворимой форме с использованием бактериального продуцента *E. coli*

Скрыпник К.А., Косоруков В.С.

Российский онкологический центр имени Н.Н. Блохина РАМН,  
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, лаборатория  
трансгенных препаратов. 115478, Москва, Каширское шоссе, 24.  
e-mail: [kssa@yandex.ru](mailto:kssa@yandex.ru).

Одним из гемопозитических факторов, широко используемых в клинической онкологии, является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека. Роль чГ-КСФ в организме состоит в стимуляции размножения и созревания нейтрофилов, участвующих в защите организма от инфекций. Введение чГ-КСФ-содержащих препаратов помогает увеличить количество нейтрофилов при нейтропении, повысить иммунитет и избежать возникновения сопряженных инфекций.

В настоящий момент существуют рекомбинантные аналоги человеческого Г-КСФ, полученные как с использованием эукариотических, так и прокариотических продуцентов. Г-КСФ, получаемый с помощью бактерий, экспрессируется в нерастворимой форме. Его экспрессия в растворимой форме позволила бы упростить очистку рекомбинантного белка, сделав процесс его получения более быстрым и дешевым.

Цель данной работы - получение штамма, экспрессирующего чГ-КСФ в растворимой форме с последующей очисткой целевого белка.

Материалы и методы. Последовательность чГ-КСФ была модифицирована с помощью ПЦР. В качестве экспрессионного вектора использовали рГУВ1 (NEB), с интеином и хитин-связывающим доменом (CBD). В результате клонирования интеин был слит с С-концом последовательности чГ-КСФ. Индукцию экспрессии проводили с помощью IPTG. Для идентификации чГ-КСФ домена в составе гибридных конструкций и полученных элюатах использовали ИФА и Вестерн-блоттинг. Для очистки белка использовали хитиновый сорбент (NEB), для индукции автопротеолитической активности интеина — ДТТ.

Результаты. В результате сайт-специфического мутагенеза с помощью ПЦР некоторые кодоны в последовательности чГ-КСФ были изменены на эффективно используемые *E.coli*. Последовательность была клонирована в рГУВ1. Полученный гибридный белок растворим, присутствует только в растворимой фракции лизатов. Гибридный белок практически полностью связывается с сорбентом, что говорит о том, что CBD функционально активен. Г-КСФ идентифицируется в составе гибридной конструкции. Это дает нам основание предположить, что он обладает третичной структурой типичной для нативного чГ-КСФ. Автопротеолитическая активность интеина индуцируется в результате добавления ДТТ. чГ-КСФ идентифицируется в полученных элюатах и его концентрация составляет 5 мг/л.

Выводы. Интеин повышает растворимость белка. Разработан и получен экспрессионный вектор, несущий последовательность чГ-КСФ, CBD и интеина. Белок экспрессируется в растворимой форме. CBD и интеин в гибридной конструкции функционально активны. чГ-КСФ, полученный в результате одноэтапной очистки, растворим и правильно свернут. Биологическая активность белка исследуется.

## Стресс-индуцированная модуляция NO-синтазной активности лактобацилл

Смоленцева О.А., Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н.

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, e-mail: [OlgaSmolentseva@mail.ru](mailto:OlgaSmolentseva@mail.ru)

Оксид азота (NO), непрерывно вырабатываемый в организме животных и человека из L-аргинина при участии семейства ферментов NO-синтаз (NOS), является одним из важнейших биологических медиаторов в организме высших эукариот и вовлечен в регуляцию множества физиологических и патофизиологических процессов [Ванин, 2001]. В связи с этим перспективным направлением современной медицины является применение NO в качестве терапевтического агента, продуцентами которого могут служить микроорганизмы комменсальной микрофлоры человека. Однако функциональное значение данного агента и механизмы регуляции его биосинтеза у микроорганизмов остаются пока мало изученными. На сегодняшний день известны важные регуляторные функции бактериального NO, заключающейся в трансдукции генетического сигнала резистентности к различным стрессам [Demple, 1996; Васильева, Мошковская, 2005; Husain, 2008]. Изучение регуляции биосинтеза оксида азота комменсальными кишечными бактериями рода *Lactobacillus* позволит разработать фундаментальные основы практического манипулирования внутриклеточными регуляторами на молекулярном уровне и наметить конкретные технологические подходы использования пробиотических препаратов для лечения заболеваний, обусловленных теми или иными отклонениями в образовании NO.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явилось выявление закономерностей биосинтеза оксида азота NO-синтазного происхождения у *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 в стрессорных условиях различного типа.

С помощью флуоресцентного окрашивания NO-чувствительными индикаторами DAA и DAF-FM DA, а также дифференциального флуоресцентного окрашивания на жизнеспособность с помощью LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kits (Molecular Probes) и последующей микроскопии мы установили, что NO-синтазная активность бактерий зависит от времени культивирования и повышается в стареющей популяции лактобацилл. Получасовое воздействие температурой 70 °C и 80 °C, губительным образом влияющее на исследуемые микроорганизмы, так же приводит к увеличению продукции ими оксида азота. Действие 60 °C нагревания на *L. plantarum* 8P-A3, напротив, не вызывает снижения жизнеспособности клеток, вместе с чем не происходит значимых изменений в синтезе NO. Особый характер NO-синтазной активности так же был отмечен при изучении воздействия рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) на продукцию оксида азота лактобациллами: начиная с 10 мкг/мл, концентрация NO убывает обратно пропорционально количеству вносимой биназы.

Таким образом, активация NOS в клетках *L. plantarum* 8P-A3 происходит при сильном стрессорном воздействии (нагревание при 70°C и 80°C, старение популяции), характеризующимся значительным снижением жизнеспособности микробных клеток. Сопоставляя с вышеизложенными эксперименты с биназой и нагреванием при 60 °C, можно заключить, что, используя стрессоры различной силы и природы, возможна модуляция NO-синтазной активности лактобацилл. Данные результаты могут быть применимы для создания пробиотических препаратов, корректирующих количества NO в макроорганизме.

## Возможность использования перифитонных микроорганизмов для биоремедиации ПАУ-загрязненных вод

Тумайкина Ю.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН  
410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов-13, e-mail: [jtumaykina@gmail.com](mailto:jtumaykina@gmail.com)

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к числу стойких органических загрязнителей, обладающих выраженным токсическим действием на живые организмы. Длительное присутствие ПАУ в воде влечет за собой различные изменения в водном биоценозе и стимулирует специфические реакции адаптации к токсиканту всех водных организмов, особенно обитающих на поверхности раздела твердых и жидких сред. Высокая адаптационная активность перифитонных микроорганизмов нашла применение в технологии биоремедиации.

Нами было выявлено влияние фенантрена (10 мг/л) на рост перифитонных микроорганизмов, выделенных с поверхности высшего водного растения элодеи канадской (*Elodea canadensis*). При инкубировании чистых культур исследованных микроорганизмов в течение 5 сут на минеральной среде с фенантrenom ингибировался рост *Acidovorax delafieldii* E1-1 и *Brevundimonas diminuta* E1-3.1 и тормозилось развитие *Kocuria rosea* E1-4.3, *Pseudomonas fluorescens* E1-2.1 и *Aquaspirillum fasciculus* E1-4.1. Добавление в среду глюкозы способствовало увеличению численности популяции штамма *Ac. delafieldii* E1-1 в 2 раза, *P. fluorescens* E1-2.1 и *Aq. fasciculus* E1-4.1 – на порядок, рост *Br. diminuta* E1-3.1 и *K. rosea* E1-4.3 напротив, незначительно угнетался.

Показано, что в деградации ПАУ в растительно-микробной ассоциации ведущая роль принадлежит перифитонным микроорганизмам. Нафталин и фенантрен могут служить единственным источником углерода и энергии для всех 5 исследованных штаммов, однако фенантрен оказался менее деградабельным. Было показано, что деструкция нафталина (100 мг/л) за 5 сут перифитонными микроорганизмами составила от 93 до 97 % относительно абиотического контроля. Убыль фенантрена зависела от его начальной концентрации: при концентрации 10 мг/л убыль составила 33,4-39,4 %; 1 мг/л – 43-85,4 %; 0,1 мг/л – 80-85,7 %. Наиболее активные деструктивные свойства продемонстрировали штаммы *Ac. delafieldii* E1-1, *P. fluorescens* E1-2.1 и *K. roseus* E1-4.3. Влияние органических кислот (янтарная, лимонная, щавелевая и яблочная), входящих в состав экссудатов элодеи, на деструкцию фенантрена (1 мг/л) проявилось по-разному в зависимости от штамма и кислоты: на *K.* E1-4.3. все кислоты оказали стимулирующее влияние, увеличивая активность на 36-41 % по сравнению с вариантом без кислот; на *P. fluorescens* E1-2.1 – только лимонная; активность остальных штаммов незначительно снизилась.

Исследование подготовительного метаболизма вышеназванных штаммов показало их способность разрушать ароматическое кольцо, за исключением *K. rosea* E1-4.3.

Таким образом, показана возможность использования перифитонных микроорганизмов для целей биоремедиации водоемов, загрязненных ПАУ.

## Новый способ получения мутантов *Pseudomonas aurantiaca* – продуцентов гиббереллинов

Феклистова И.Н., Скакун Т.Л., Максимова Н.П.

Белорусский государственный университет. 220030, Беларусь, Минск,  
пр. Независимости, 4, e-mail: [feklistova\\_iren@rambler.ru](mailto:feklistova_iren@rambler.ru)

Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* способны стимулировать рост растений, что обусловлено синтезом регуляторов роста растений типа индолилуксусной кислоты, гиббереллинов, цитокининов, витаминов, улучшением минерального питания, регуляцией синтеза этилена корнями, повышением устойчивости к стрессам и т.д. В настоящее время в сельском хозяйстве применяются препараты, содержащие гиббереллины. Например, гибберелловую кислоту используют для повышения урожайности кишмишных сортов винограда и цитрусовых, увеличения вегетативной массы в луговодстве; обработка гиббереллином стимулирует рост побегов чайного куста и повышает в листьях содержание танина.

Синтез гиббереллинов у растений и низших грибов подвержен ингибированию рядом соединений, являющихся ретардантами роста растений: ССС (2-хлорэтил)триметил аммоний хлорид), АМО-1618 (2-изопропил-4-диметиламин-5-метилфенил-1-пиперидин карбоксилат метилхлорид), анцимидол ( $\alpha$ -циклопропил- $\alpha$ -( $p$ -метоксифенил)-5-пиримидин метил этанол), Alar (сукцинат-2,2-диметилгидразид), Polaris (N,N-бис(фосфонометид)глицин) и т.д. Нами было сделано предположение, что использование токсических аналогов гормонов роста растений в качестве селекционирующего агента позволит отобрать мутантные штаммы бактерий, способные к сверхсинтезу гиббереллинов. Регуляторные мутанты получали путем обработки бактерий N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ) с последующей селекцией на ССС. Концентрацию гиббереллинов, синтезируемых бактериями, определяли флуориметрически, а биологическую активность гиббереллинов определяли с помощью биотеста на растениях латука *Lattuca sativa*.

Установлено, что уровень продукции гиббереллинов аналог-резистентными мутантами достигает 31 мг/л, что 2,3 раза больше, чем таковой у бактерий дикого типа. При этом следует отметить, что продуктивность известных в этом отношении бактериальных штаммов не превышает 18 мг/л: *Pseudomonas fluorescens* – 2 мг/л, *Rhizobium trifolii* – 3 мг/л, *Bacillus cereus* – 15 мг/л, *Bacillus subtilis* – 18 мг/л. Исследование ростостимулирующей активности аналогрезистентных мутантов *P. aurantiaca* с различным уровнем образования гиббереллинов показало, что их действие зависит от продуктивности бактерий. Например, обработка семян клетками штамма *P. aurantiaca* В-162 приводит к увеличению длины гипокотилей в 1,88 раза по сравнению с контролем (вода), а клетками штамма G-50 (уровень синтеза гиббереллинов в 2,3 раза выше, чем у В-162) – в 3,37 раза.

Следует отметить, что бактерии *P. aurantiaca* В-162 обладают рядом других полезных свойств, в частности, являются штаммом-антагонистом по отношению к возбудителям болезней сельскохозяйственных культур, что обусловлено синтезом антибиотиков феназинового ряда и пирролнитрина.

## Использование промоторов Pho-регулона для метаболически регулируемого биосинтеза L-фенилаланина (Phe) в *Escherichia coli*

Цыренжапова И.С., Дорошенко В.Г., Айрих Л.Г., Казакова С.М., Машко С.В.

*Аджиното-Генетика исследовательский институт, 117545, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д.1. e-mail: [vera\\_doroshenko@agri.ru](mailto:vera_doroshenko@agri.ru)*

Сверхпродукция аминокислот, достигаемая в конструируемых штаммах-продуцентах за счет снятия негативной клеточной регуляции и использования для транскрипции целевых генов биосинтеза конститутивных промоторов, может приводить к существенному замедлению роста клеток и снижению эффективности биотехнологического производства. Актуальной задачей является разработка метаболически регулируемого процесса, в котором интенсивный биосинтез включался бы по мере накопления биомассы. Хорошо охарактеризованной метаболически регулируемой системой является Pho-регулон *E.coli*, индукция которого при росте клеток на стандартных средах происходит при истощении растворимого неорганического фосфата ( $P_i < 0.1 \text{ mM}$ ). Традиционно считалось, что такая концентрация  $P_i$  будет индуцировать вхождение клеток в стационарную фазу, характеризующуюся снижением общей метаболической активности и усиленной деградацией белков. Поэтому промоторы Pho-регулона использовали для высокоэффективного накопления токсичных для клетки рекомбинантных белков в ограниченной по времени ферментации. До недавнего времени не было попыток применения Pho-регуляции для биосинтеза аминокислот, витаминов и других интермедиатов нормального клеточного метаболизма. Наше исследование Phe-продуцента *E.coli*, культивируемого на комплексных питательных средах, показало, что Pho-регулон (тестируемый по активности щелочной фосфатазы-PhoA) может индуцироваться на различных стадиях роста клеток, что зависит от соотношения  $P_i$  и аминокислот в среде. Эта индукция может происходить в логарифмической фазе роста при истощении  $P_i$ , когда необходимый для дальнейшего роста фосфат накоплен к этому моменту, по-видимому, в виде полифосфатов.

На основании обнаруженного эффекта элементы Pho-регулона были использованы для метаболически регулируемого биосинтеза Phe в *E. coli*.

Ключевым ферментом биосинтеза ароматических соединений в *E. coli* является ДАНР-синтаза (EC 4.1.2.15), синтезирующая первый предшественник этих соединений из интермедиатов центрального метаболизма: фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата. В штамме MG1655 $\Delta$ *tyrA htrE::P<sub>L</sub>-yddG hsdR::miniMu-aroG4-pheA<sup>Fbr</sup>-aroL* у гена *aroG4*, кодирующего устойчивую к Phe мутантную ДАНР-синтазу, нативная регуляторная область была заменена на промоторы Pho-регулона:  $P_{phoA}$  или  $P_{pstS}$ , дифференцированно узнаваемые комплексами РНК-полимеразы с  $\sigma^D$  или  $\sigma^S$  –субъединицами. Показано, что, по сравнению с исходным вариантом, полученные штаммы с метаболически индуцируемым синтезом ДАНР-синтазы способны более эффективно накапливать Phe в культуральной среде, не уступая своему предшественнику в уровне образования бактериальной биомассы.

## Характеристика репликона pBS72 с увеличенным числом копий

Чалей В.А., Лагодич А.В., Карпиевич М.Н., Титок М.А.

Белорусский государственный университет, биологический факультет,  
220030, Минск, Беларусь, Пр. Независимости, д. 4, e-mail: [LagodichAV@bsu.by](mailto:LagodichAV@bsu.by)

Конъюгативная плазида pBS72 тета-типа природных бактерий *B. subtilis* является малокопийной (5 копий на хромосому). Показано, что мини-репликон данного внехромосомного элемента может быть использован для создания векторных систем для молекулярного клонирования. Варианты с измененным числом копий могут служить основой для конструирования векторных систем, а также для изучения тонких механизмов репликации и сегрегации. Для изменения числа копий мини-репликона плазмиды pBS72, детерминирующей устойчивость к хлорамфениколу в концентрации 5 мкг/мл использовали химический мутагенез *in vitro* (гидроксиламин). Мутантные конструкции были отобраны путем прямой селекции трансформантов *B. subtilis* 168 *trpC2* на средах с повышенной концентрацией хлорамфеникола (50 мкг/мл). Мутационные изменения, приводящие к увеличению числа копий плазмидного репликона, были картированы путем секвенирования. На основании анализа электрофореграмм было установлено увеличение отношения фракций плазмидной ДНК к хромосомной от 2 до 10 раз по сравнению с исходным вариантом, что свидетельствовало об увеличении числа копий исследуемых мутантов.

Мутации были выявлены в области *dnaA*-бокса, *oriV*-сайте и *repA*-гене. В последовательности *dnaA*-бокса, примыкающего к сайту *oriV*, обнаружены три точечные делеционные мутации, причем одна из них, присутствовала во всех проанализированных вариантах. В области *oriV* достаточно часто обнаруживалась замена аденина на гуанин в последовательности инвертированного повтора (обнаружена у пяти из семи проанализированных мутантов). В пределах *repA*-гена выявлены трансверсии и транзиции, приводящие к изменению в области домена полипептидной цепи *RepA*, предположительно обладающего ДНК-связывающей активностью, а также транзиции в области характерной для доменов с АТФ-азной активностью.

Подобно исходному мини-репликону плазмиды pBS72 все исследованные мутантные варианты характеризовались стабильностью наследования в клетках типового штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* и утрачивались с частотой более 90% из бактерий *B. Subtilis* L1432, несущих мутацию гена *dnaB19*. Исключение составил вариант, содержащий транзицию в области инвертированного повтора *oriV* сайта и делецию последовательности *dnaA*-бокса (стабильность наследования увеличилась в 10 раз). Исходя из возможных функций белка *DnaB*, можно предположить, что изменение в области инициации репликации приводит не только к изменению числа копий, но также влияет на процессы распределения дочерних молекул плазмидной ДНК в процессе деления.

## Получение мутантов *Bacillus subtilis*, зависимых по биотину

Чеписюк Н.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра микробиологии, 220030 Беларусь, г. Минск, Пр. Независимости 4.

e-mail: [fluke710@mail.ru](mailto:fluke710@mail.ru)

Широкое применение биотина в промышленности, медицине, научных исследованиях обуславливает повышение интереса к возможности его биотехнологического получения. Одними из возможных перспективных штаммов-продуцентов этого витамина являются бактерии вида *Bacillus subtilis*. Анализ осуществляемых модификаций, с целью повышения продукции определенного соединения в клетках бактерий, предполагает использование бактерий, мутантных по продукции данного соединения. В данной работе для получения мутантов по биосинтезу биотина применяли метод локального инсерционного мутагенеза.

Биотиновый оперон *B. subtilis* образован шестью структурными генами *bioWAFDBI* с предшествующей промоторно-операторной областью. В качестве мишени для направленного мутагенеза был выбран ген *bioA*, отвечающий за синтез ДАРА-синтетазы – фермента, осуществляющего синтез 7,8-диаминопимелиновой кислоты на пути биосинтеза биотина. Фрагмент хромосомной ДНК *B. subtilis* 168t, содержащий ген *bioA*, амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров bioA1, bioA2. Размер продукта амплификации составил 1347 п. н. Амплифицированный фрагмент ввели в плазмидный вектор pUC18 по сайту узнавания рестриктазы *Vam*HI. с последующей трансформацией клеток *E. coli* XL1-Blue. В результате была получена гибридная плаزمида pBioA2. Для доказательства наличия в составе рекомбинантной плазмиды pBioA2 структурного гена биотинового оперона *bioA* проводили рестрикционный анализ, комплементационный тест, а также определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента. В результате комплементационного теста была показана способность мутантных бактерий штамма *E. coli* R879(*bioA*<sup>-</sup>), трансформированных плазмидой pBioA2, расти на минимальной среде без биотина. Сравнение полученных в ходе реакции секвенирования нуклеотидных последовательностей (904 н.п.), с представленными в базах данных (GenBank (NCBI)), а также результаты рестрикционного анализа и комплементационного теста подтвердили наличие соответствующего гена в составе рекомбинантной плазмиды.

Инактивацию *in vitro* гена *bioA* осуществляли посредством вставки в центральную область гена по уникальному сайту действия рестриктазы *Bss*NAI детерминанты устойчивости к хлорамфениколу, источником которой являлась плаزمида pMTL21C. В результате была получена плаزمида pBA2C4, которую использовали для трансформации клеток штамма *B. subtilis* 168t. Селекцию трансформантов проводили по признаку устойчивости к хлорамфениколу. Устойчивость клеток *B. subtilis* 168t к хлорамфениколу свидетельствовала об интеграции маркера антибиотикорезистентности в хромосому в области биотинового оперона, что фенотипически выражалось в появлении ростовой зависимости от биотина полученных мутантов.

## Особенности регуляции биотинового оперона в клетках бактерий *Bacillus subtilis* и замена его природного промотора на конститутивный *spac*-промотор

Чеписюк Н.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра микробиологии, 220030 Беларусь, г. Минск, Пр. Независимости 4.  
e-mail: [fluke710@mail.ru](mailto:fluke710@mail.ru)

Биотиновый оперон *Bacillus subtilis*, контролирующий биосинтез биотина, образован шестью структурными генами *bioWAFDBI*, с предшествующей промоторно-операторной областью. Регуляция данного процесса осуществляется на уровне экспрессии генов белком – регулятором *VirA*, который в виде двух мономеров способен связываться с операторной областью биотинового оперона.

Одним из подходов к созданию штаммов-продуцентов биотина является снятие негативной регуляции экспрессии генов биотинового оперона конечным продуктом, что может осуществляться посредством замены природного промотора биотинового оперона на другой промотор, не являющийся субстратом для регуляторного белка, и как следствие не регулируемого биотином.

Основной целью данной работы являлось снятие негативной регуляции природного промотора биотинового оперона *B. subtilis* посредством его замены на гибридный *spac*-промотор для обеспечения конститутивного синтеза биотина в клетках бактерий.

Основой для получения конструкции, пригодной для замены промотора служила плаزمида *pW2*, которая получена на основе вектора *pMUTIN4*, содержащего *Col* E1-репликон, детерминанты антибиотикорезистентности к ампициллину и эритромицину, *lacZ*, ген-регулятор *lacI* и *spac*-промотор. За *spac*-промотором в *pW2* расположен клонированный в область полилинкера фрагмент ДНК (341 п.н.), содержащий участок, предшествующий первому гену биотинового оперона и несущий в своем составе RBS-сайт, а также начальную область первого гена оперона *bioW*. Наличие *Col* E1-репликона обеспечивает наследование данного вектора в клетках *Escherichia coli*. Трансформация же клеток *B. subtilis* вектором *pW2* приводит к интеграции всей конструкции в хромосому за счет гомологичной рекомбинации, в результате чего клонированный фрагмент помещается под контроль *spac*-промотора. Снятие негативной регуляции *spac*-промотора белком-регулятором *LacI*, продуктом гена *lacI*, осуществляется посредством добавления в среду индуктора IPTG. Для обеспечения конститутивного синтеза продуктов генов, находящихся под контролем *spac*-промотора было необходимо подвергнуть модификации исходную конструкцию *pW2*, а именно удалению гена-регулятора. Этого удалось достигнуть посредством делеции участка *pW2*, содержащего ген *lacI*. В результате была получена плаزمида *p4WN5*, которую использовали для трансформации клеток штамма *B. subtilis* 168t. По результатам трансформации был отобран ряд клонов, устойчивых к эритромицину. Соответствие механизма и результатов интеграции в хромосому рекомбинантного вектора ожидаемому было подтверждено посредством полимеразной цепной реакции с использованием праймеров для амплификации различных участков промоторно-операторной области и начала первого гена оперона, а также области *spac*-промотора и первого гена биотинового оперона. Результаты полимеразной цепной реакции свидетельствовали о разрыве исходной промоторно-операторной области и помещении биотинового оперона под контроль *spac*-промотора.

## Структура гена *speA*, супрессирующего патогенность *Erwinia carotovora*, и возможность альтернативной его трансляции

Чернышов С.В.<sup>1</sup>, Масулис И.С.<sup>2</sup>, Гороховатский А.Ю.<sup>1</sup>, Бурьянов Я.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН, 142290, Пущино, Московская обл.

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Московская обл.  
e-mail: [svch2@rambler.ru](mailto:svch2@rambler.ru)

Ген *speA*, локализованный на плазмиде рAM28, супрессирует патогенность бактерий рода *Erwinia*. Анализ нуклеотидной последовательности плазмиды позволил выявить структурную часть гена, а также регуляторные сигналы транскрипции и трансляции. При поиске промоторной области гена была использована программа "PlatProm", алгоритм которой позволяет сканировать нуклеотидную последовательность, учитывая ряд структурных особенностей промоторной ДНК и оценивая их вклад, и каждой точке в геноме присваивать коэффициент подобия идеальному промотору. Эксперименты, проведенные по проверке транскрипционной активности *in vitro* предполагаемого промотора, подтвердили результаты компьютерного сканирования последовательности плазмиды. Функциональная активность найденного промотора РСН была продемонстрирована при клонировании репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка *egfp* под данный промотор и показан конститутивный характер его действия как в клетках кишечной палочки, так и в клетках эрвиний. Структурная часть гена представлена открытой рамкой считывания (ОРС), способной кодировать белок, максимально состоящий из 368 аминокислот. Характерной особенностью данной ОРС является то, что в ее пределах расположены шесть AUG кодонов, способных быть иницилирующими, а перед тремя из них находятся потенциальные последовательности Шайна-Дальгарно (SD). Функциональный анализ *in vivo* каждой из трех последовательностей SD, проведенный с использованием гена *egfp*, показал активность в клетках *E. coli*, по крайней мере, двух из них, SD1 и SD3. Об активности клонированных структур судили по флуоресценции колоний клеток, содержащих соответствующие генетические конструкции.

Клонирование фрагмента гена *speA*, содержащего все три потенциальные последовательности SD, в одной рамке с геном *egfp* позволило прояснить характер их функционирования в клетках кишечной палочки. Предполагалось, что результатом такого клонирования должно быть образование одного или нескольких химерных белковых продуктов различного размера, в зависимости от того, сколько и какие именно SD проявляют активность в данной конструкции. При разделении тотальных клеточных белков *E. coli* в полиакриламидном геле были зафиксированы несколько флуоресцирующих полос различной интенсивности, соответствующих белкам разного размера. Проведение вестерн-блот анализа с использованием поликлональных антител к GFP подтвердило эти результаты. Это явилось свидетельством того, что в бактериальной клетке одновременно могут функционировать несколько последовательностей Шайна-Дальгарно. Причем, судя по интенсивности сигнала, наибольшей активностью обладала структура SD3. Таким образом, в результате структурно-функционального анализа гена *speA* были охарактеризованы сигналы регуляции транскрипции и трансляции. На модельной системе *E. coli* показана принципиальная возможность альтернативного старта трансляции с одновременным образованием белковых продуктов разного размера и различающихся по аминокислотному составу N-концевого фрагмента.

## **Взаимодействие пробиотиков с нормофлорой и патогенной микрофлорой при длительном совместном культивировании на плотных питательных средах**

Чертович Н.Ф.<sup>1</sup>, Козловский Ю.Е.<sup>1,2</sup>, Хомякова Г.И.<sup>1</sup>, Степанов С.А.<sup>1,2</sup>, Козловская Г.В.<sup>3</sup>, Аренбаум Е.Л.<sup>2</sup>, Хомяков Ю.Н.<sup>4</sup>, Доброхотский О.Н.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ морфологии человека РАМН, Москва, 117481, ул. Цурюпы, д.3.

<sup>2</sup> ГНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева РАСХН Московская обл. 140143, Раменский район, п. Родники, ул. Трудовая, д. 6  
e-mail: [NIIPZK@mail.ru](mailto:NIIPZK@mail.ru), [tatkhom@mail.ru](mailto:tatkhom@mail.ru)

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН, Москва

<sup>4</sup> НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова, Москва

<sup>5</sup> ФГУП НИЦ токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов ФМБА России, Серпухов.

Появившиеся в последнее время данные о роли пробиотических препаратов в возникновении дисбиотических состояний заставляют более внимательно относиться к изучению их взаимодействия с нормофлорой. Значительная роль при этом отводится методам *in vitro*, но большинство из применяемых с этой целью методов способны зафиксировать лишь антагонистические отношения.

В работе мы использовали метод длительного совместного культивирования бинарных культур на плотных питательных средах. В качестве пробиотиков использовали известные препараты Колибактерин и Лактобактерин, а также рекомбинантный пробиотик Энтероцин, созданный на основе резидентного штамма *E. coli*, и Субэнтерин на основе штаммов бацилл спектра *B. subtilis*. Тест-культурами служили представители нормофлоры желудочно-кишечного тракта и патогенные штаммы *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. pyogenes*.

В большинстве случаев взаимодействия между компонентами развивались по типу антибиоза или конкурентного равновесия. Наиболее яркий антагонизм наблюдался между таксономически близкими микроорганизмами, так Колибактерин и Энтероцин эффективно подавляли развитие нормальных и патогенных эшерихий. Явный антагонизм наблюдался между *E. coli*, входящей в состав Энтероцина, и сальмонеллами, практически не высевавшимися из контактной культуры к концу срока культивирования. Пробиотические лактобациллы эффективно подавляли резидентных к третьей неделе. Менее выражено было влияние лактобацилл на патогенную микрофлору, но и в этом случае они становились доминантным видом. Бациллы проявляли ярко выраженный антагонизм по отношению к патогенным стрептококкам, оказывали угнетающее влияние на энтерококки и практически не влияли на лактобактерии. Ни в одном из случаев симбиотические взаимоотношения между контактными культурами зафиксированы не были.

## Способ получения микробного препарата для предпосевной инокуляции семян тритикале

Шестакова Е.А., Алещенкова З.М.

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. акад.  
Купревича, д. 2, e-mail: [ekatya@tut.by](mailto:ekatya@tut.by)

Важнейшей проблемой отечественного земледелия является производство в требуемом объеме высококачественного продовольственного и кормового зерна. Возделывание тритикале, гибрида ржи и пшеницы, является актуальным, поскольку новая зерновая культура обладает ценными хозяйственно-биологическими свойствами (высокая урожайность, устойчивость к засухе и заболеваниям, повышенное содержание белка в зерне). Для стимуляции роста зерновых культур применяют различные биопрепараты, обогащающие ризосферу растений полезными микроорганизмами. В частности, интродукция в злаковый агроценоз ассоциативных diaзотрофов, способных фиксировать азот атмосферы, благоприятно сказывается на продуктивности растений.

С целью получения микробного препарата для предпосевной инокуляции семян были выделены 18 изолятов ассоциативных diaзотрофов из ризопланы тритикале. По комплексу хозяйственно-ценных свойств (азотфиксирующая способность, ростстимулирующий эффект) был отобран ассоциативный diaзотроф *Rhizobium sp.17*.

Подбор оптимальной питательной среды и количества посевного материала, обеспечивающих высокий титр исследуемой культуры *Rhizobium sp.17*, проводили в условиях глубинного культивирования на лабораторной качалке (220 об/мин) при 22°C в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл питательной среды. Культивирование осуществляли на средах: кукурузно-мелассной, мелассно-минеральной и мясо-сусло, при внесении посевного материала в количестве 5, 10 и 20% от объема среды.

Численность жизнеспособных клеток исследуемого штамма определяли в начале культивирования и через 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 часов. Число колониобразующих единиц (КОЕ) определяли методом предельных разведений на МСА. Наиболее высокие титры *Rhizobium sp.17* в процессе 4-х суток культивирования получены на кукурузно-мелассной среде. Максимальное количество жизнеспособных клеток diaзотрофа составило  $5,2 \cdot 10^9$  КОЕ/мл (72 ч) при внесении 10% посевного материала.

Отработку оптимальных параметров культивирования *Rhizobium sp.17* на лабораторном ферментационном стенде проводили в ферментаторе АНКУМ-2М объемом 3 литра на кукурузно-мелассной среде при различных режимах аэрации (0,5 и 1,5 л воздуха/л среды). Установлено, что оптимальными технологическими параметрами культивирования *Rhizobium sp.17* в ферментаторе на кукурузно-мелассной среде являются: температура - 28°C, аэрация - 0,5 л воздуха/л среды, время культивирования - 36 ч, количество посевного материала - 10% от объема среды, что обеспечивает получение высокого титра жизнеспособных клеток *Rhizobium sp.17* -  $2,3 \cdot 10^9$  КОЕ/мл.

Применение микробного препарата на основе *Rhizobium sp.17* обеспечило повышение урожайности тритикале и экономию минеральных азотных удобрений.

## Экспрессия фитазы *Obesumbacterium proteus* B-6897 в дрожжах *Yarrowia lipolytica*

Эпова Е.Ю., Выборная Т.В., Соболевская Т.И., Лаптев И.А., Синеокий С.П.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов. 117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1. E-mail: [ekaterina\\_epova@hotmail.com](mailto:ekaterina_epova@hotmail.com)

В настоящее время в производстве кормов для животных возрастает доля сырья растительного происхождения. Преобладающей формой накопления фосфора в зерне, семенах масличных и бобовых является фитат (мио-инозитол гексакисфосфат), который не усваивается животными с однокамерным желудком из-за отсутствия или низкой активности ферментов, способных расщеплять фитат, в гастроэнтеральном тракте [1]. Кроме того, фитаты уменьшают доступность белков и микроэлементов в кормах. Следовательно, возрастает потребность кормопроизводства в добавках, которые позволяли бы переводить фитатный фосфор в усвояемую форму. На практике для этих целей успешно используются фитазы.

Фитазы представляют собой ферменты, способные отщеплять фосфатные группы фитатов. В результате образуется инозитол и соли фосфорной кислоты, хорошо растворимые при кислом значении рН желудка и кишечника, способные усваиваться организмом.

Ранее в нашей лаборатории была выполнена работа по клонированию и экспрессии в клетках диморфных аскомицетных дрожжей *Yarrowia lipolytica* гетерологичной фитазы *PhyA*-Op из *Obesumbacterium proteus* (B-6897). Было установлено, что рекомбинантный фермент обладает высокой активностью и термостабильностью, однако секретируется в среду в небольшом количестве [2].

Цель настоящей работы – введение в геном *Y. lipolytica* нескольких копий фитазы *O. proteus* для увеличения продукции фермента.

В качестве реципиента был выбран штамм *Y. lipolytica* Pо1f, маркированный двумя делециями в генах *URA3* и *LEU2*. Штамм Pо1f также содержит делеции в структурных генах двух основных секретируемых протеаз *AXP2* и *XPR2*, что препятствует гидролизу секретируемых гетерологичных ферментов.

Для интеграции в геном и экспрессии фитазы использован вектор рМН, содержащий сильный квазиконститутивный синтетический промотор hp4d, терминатор гена *XPR2* и сигнальную последовательность для секреции фермента - ргерго *XPR2*, Zeta-последовательности (длинный концевой повтор транспозона YL1) в качестве сайта интеграции и делетированный маркер *uga3d4*, который комплементирует ауксотрофность по урацилу лишь при количестве копий больше трех [3,4].

Аmplифицированный ген *PhyA*-Op был клонирован в вектор рМН; полученная в результате конструкция называется рМН-PhyA (рис. 1). Для трансформации *Y. lipolytica* использовался литиевый метод; отбор трансформантов проводился на минимальной среде, не содержащей урацил. Клетки трансформировали плазмидой рМН-PhyA, линеаризованной по сайтам NotI. Трансформанты секретируют в культуральную жидкость белок весом более 45 kDa, что согласуется с ожидаемым весом 45,42 kDa (Рис. 2). Активность фитазы в

культуральной жидкости полученного в результате многокopiesной трансформации дрожжевого штамма составляет 29,5 ед/мл, в то время как в случае введения в геном одной копии гена активность составляла 6 ед/мл. Таким образом, введение дополнительных копий гена фитазы обеспечивает усиление экспрессии фермента.

Рисунок 1. Экспрессионный вектор рМН - PhyA.

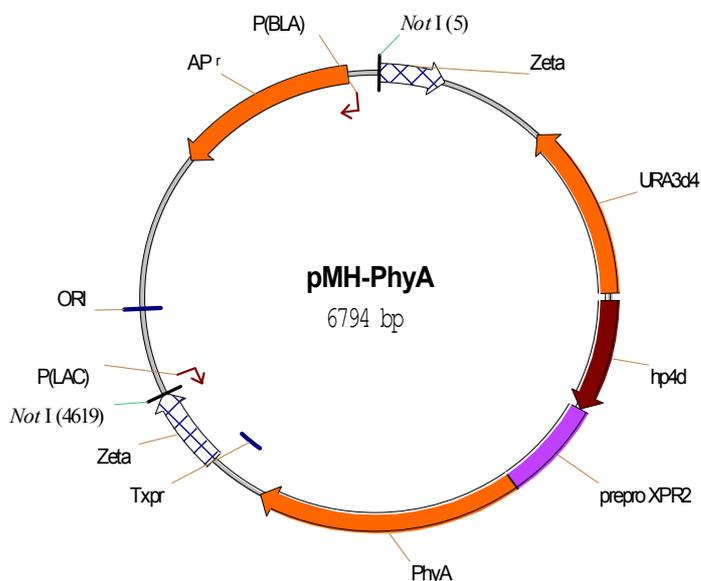
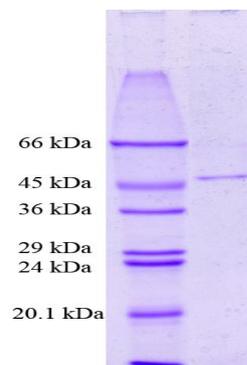


Рисунок 2. Электрофорез белков культуральной жидкости трансформантов



### Литература:

1. Bitar K., Reinhold J.G. (1978) Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. – Biochim. Biophys. Acta., 268, 442-452.
2. Тихонова Е.Ю., Синеокий С.П. (2006) Гетерологичная экспрессия генов бактериальных фитаз PhyA *Citrobacter freundii* и *Obesumbacterium proteus* в аскомицетовых диморфных дрожжах *Yarrowia lipolytica*. – Тезисы конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология». Москва-Пушино.
3. Madzak C., Blanchin-Roland S., Gaillardin C. Upstream activating sequences and recombinant promoter sequences functional in *Yarrowia* and vectors containing them. European Patent Application EP0747484A1.
4. Pignede G., Wang H.-J., Fudalej F., Seman M., Gaillardin C., Nicaud J.-M. (2000) Autocloning and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. – Appl. Environ. Microbiol., 66, 8, 3283-3289.

# **Работы молодых учёных и преподавателей**

## Создание генетической конструкции рСМV-ЕТА-EGFP и эффекты её экспрессии в опухолевых клетках человека линии HeLa

Андрющенко А.С., Глинка Е.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, [quality4@rambler.ru](mailto:quality4@rambler.ru)

Конструирование и направленная доставка в клетки векторов, экспрессирующих токсичные для живых клеток белки, является перспективным направлением генотерапии злокачественных опухолей. Одним из таких токсичных белков является экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, грам-отрицательной палочковидной аэробной бактерии, патогенной для человека. Попадая в клетку-мишень, токсин вызывает АДФ-рибозилирование фактора элонгации-2 (EF-2), инактивирует его и останавливает белковый синтез, приводя клетку к гибели по пути апоптоза (Caraglia et al, 2000; Jenkins et al, 2004). Экспрессия подобных токсичных белков под контролем опухолеспецифичного промотора приводит к селективному уничтожению раковых клеток (Glinka et al, 2006). Нами был сконструирован вектор для экспрессии гибридного белка, состоящего из экзотоксина А (ЕТА) и зелёного флуоресцентного белка (EGFP), под контролем цитомегаловирусного промотора (СМV). Рестрикционный анализ и секвенирование созданной конструкции подтвердили наличие вставки участка гена ЕТА в векторе рEGFP-N1 и отсутствие нуклеотидных замен в клонированной последовательности ДНК. Клонирование проводили в штамме *Escherichia coli* XL1-Blue, являющимся толерантным к присутствию плазмиды, кодирующей экзотоксин А. Др. Вi Y-М с сотрудниками (2001) не имели успеха в клонировании цитотоксичной рибонуклеазы барназы под СМV промотором в *E.coli*, хотя теоретически барназа не должна экспрессироваться под контролем СМV промотора в *E. coli*. Авторы сделали вывод, что используемый ими штамм не был толерантным к присутствию плазмиды, кодирующей барназу. В настоящей работе мы изучили эффекты экспрессии данного гибридного белка в опухолевых клетках человека линии HeLa. В качестве контрольной конструкции использовали вектор, кодирующий EGFP. В клетках, трансфицированных рСМV-ЕТА-EGFP и котрансфицированных рСМV-ЕТА-EGFP и рEGFP-N1, мы наблюдали снижение интенсивности флуоресценции по сравнению с интенсивностью флуоресценции клеток, трансфицированных рEGFP-N1, с помощью флуоресцентной микроскопии и метода проточной цитометрии. Анализ количества апоптотических клеток в культуральной среде методом исключения трипанового синего красителя показал высокий токсический эффект гибридного белка ЕТА-EGFP, который проявлялся в массовой гибели клеток, трансфицированных рСМV-ЕТА-EGFP и котрансфицированных рСМV-ЕТА-EGFP и рEGFP-N1, уже через 24 ч после трансфекции. Также нами были получены свидетельства в пользу ингибирования белкового синтеза в клетках, трансфицированных рСМV-ЕТА-EGFP, основанные на характерном изменении локализации специфического белка UBF (ко-фактора РНК-полимеразы I), т.е. миграции его из ядрышек клеток в нуклеоплазму. Подобное изменение локализации белка UBF происходит при действии различных ингибиторов трансляции белка. На Рис. 1 (б) показано, что в нетрансфицированных клетках UBF находится в ядрышках, а в клетках, трансфицированных рСМV-ЕТА-EGFP, белок UBF локализуется в нуклеоплазме (Рис. 2, б). Белок UBF принимает непосредственное участие в транскрипции рибосомных генов, и воздействие на него является критичным для сборки рибосом и синтеза белка. Таким образом,

существенное снижение интенсивности флуоресценции клеток, трансфицированных рСМV-ETA-EGFP, большое количество апоптотических клеток, изменение локализации UBF свидетельствуют о синтезе в клетках белка ETA-EGFP. Создание плазмиды рСМV-ETA-EGFP даёт возможность на первом этапе исследований подобрать культуры эукариотических клеток, в которых экспрессия гибридного белка приводит к наиболее мощным токсическим эффектам, а на втором этапе - решить вопрос о выборе оптимального ткане- или опухолеспецифичного промотора для селективной регрессии раковых клеток.

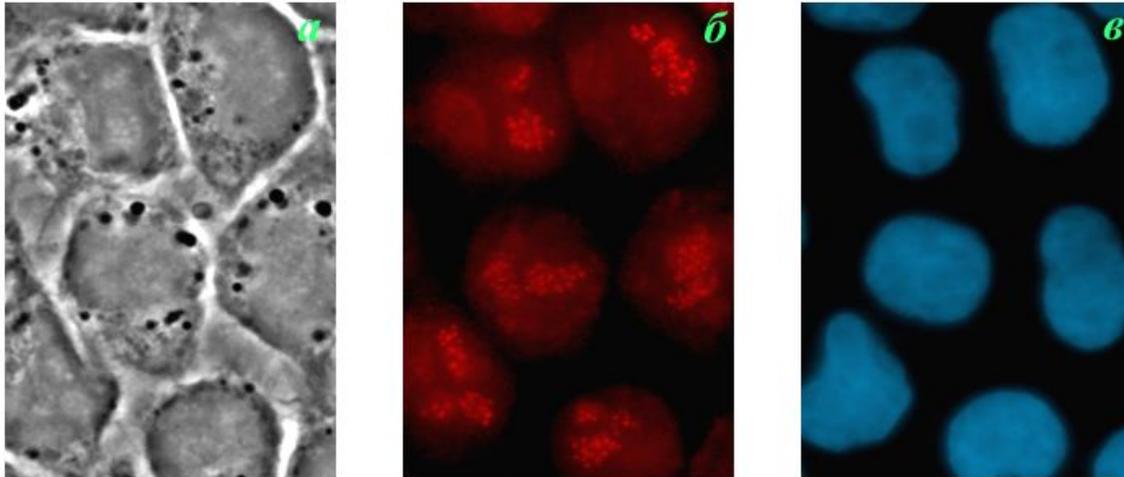


Рис. 1. Локализация UBF в нетрансфицированных клетках. а – фазовый контраст, б – иммуноокрашивание UBF, в – окрашивание ДАФИ на хроматин

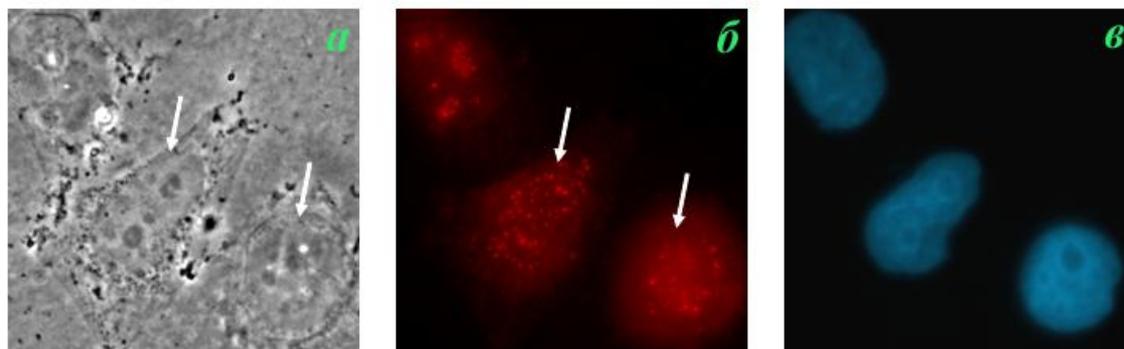


Рис. 2. Локализация UBF в клетках, трансфицированных рСМV-ETA-EGFP. а – фазовый контраст, б – иммуноокрашивание UBF, в – окрашивание ДАФИ на хроматин

#### Литература:

1. *Bi Y.M., Rothstein S.J., Wildeman A.G.* (2001) – *Gene*, 279, 175-179.
2. *Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M.* (2006) – *Gene* 366, 97-103.
3. *Jenkins C.E., Swiatoniowski A., Issekutz A.C., Lin T. J.* (2004) – *J. Biol. Chem.* 279, 37201-37207.
4. *Caraglia M., Budillon A., Vitale G., Lupoli G., Tagliaferri P., Abbruzzese A.* (2000) *Eur. J. Biochem.*, 267, 3919–3936.

## Метилотрофные дрожжи как основа биосенсора для детекции низших алифатических спиртов

Антонова О.Ю.<sup>1,2,3</sup>, Кувичкина Т.Н.<sup>3</sup>, Ашин В.В.<sup>3</sup>, Решетиллов А.Н.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Пуцинский Государственный Университет, г. Пуцино Московской обл.

<sup>2</sup>Институт биологического приборостроения РАН, г. Пуцино Московской обл.

<sup>3</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, г.Пуцино Московской обл.

e-mail: [antonovaolga07@rambler.ru](mailto:antonovaolga07@rambler.ru)

Определение низших алифатических спиртов, в частности метанола и этанола, является актуальной задачей, поскольку эти спирты содержатся в продуктах пищевой (алкогольные напитки), косметической и фармацевтической промышленности. Использование для детекции спиртов биосенсоров обладает такими преимуществами как быстрота проведения анализа, компактности используемого для этого прибора, а также возможность создания моделей для работы в полевых условиях. В настоящее время разработаны биосенсоры для детекции спиртов на основе фермента алкогольоксидазы. Однако получение и очистка ферментов - достаточно длительный и трудоемкий процесс. В данной работе в качестве биоэлемента используются целые клетки метилотрофных дрожжей, содержащие фермент алкогольоксидазу.

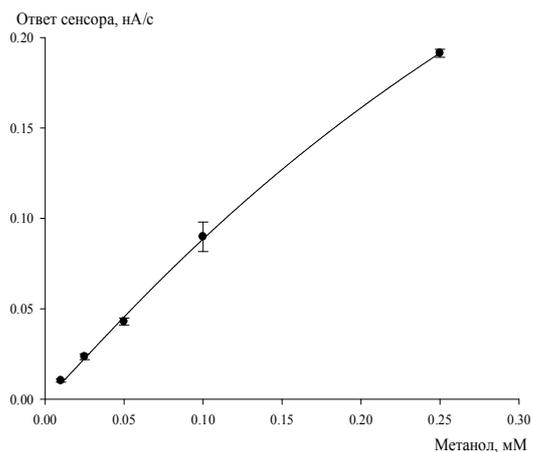
Важным моментом в создании биосенсора является приготовление биорецептора. Как правило, клетки, иммобилизованные на носителе, прикрепляют к электроду Кларка. Часто для иммобилизации клеток применяют полимерные пленки, такие как ацетат целлюлоза. Полиионные электролиты, благодаря их водорастворимости, используются для получения микрокапсул с биологическими молекулами, что представило интерес использования этих полимеров для приготовления биорецепторов.

Целью данной работы являлось сравнение методов иммобилизации физической адсорбцией с последующим покрытием ацетат целлюлозой и с покрытием полиионами.

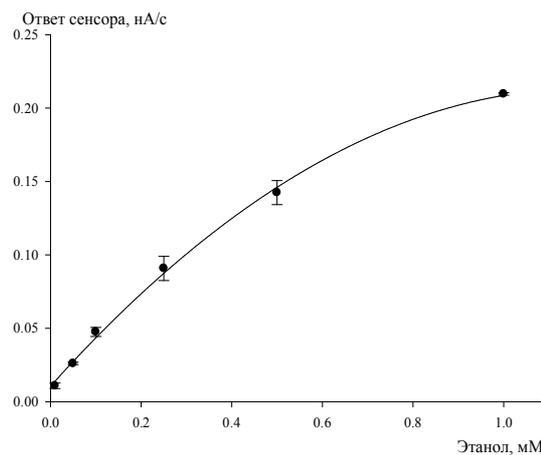
Объектом исследования являлись метилотрофные дрожжи *Hansenula polymorpha* NCYC 495 *ln*. Культивирование дрожжей проводили на минеральной среде с глицерином в периодическом режиме в колбах на качалке. Иммобилизацию клеток проводили путем физической адсорбции на хроматографической стекlobумаге GF/A с последующим покрытием полученного биорецептора 1%-ным раствором ацетат целлюлозы или последовательным покрытием водными растворами: анионного полиэлектролита [поли(стиролсульфонат натрия)] (PSS) с катонным полиэлектролитом [поли(аллиламин гидрохлорид)] (PAH). Полученный биорецептор 0,5×0,5 см<sup>2</sup> помещался на мембрану электрода Кларка. Измеряемым параметром является максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации кислорода.

Показано, что иммобилизация методом физической адсорбции на стекlobумаге с последующим покрытием полимерными материалами удовлетворяет требованиям, предъявляемым к биорецептору. Полученные биорецепторы функционировали без потери активности в течение 7 суток.

На рис. 1 представлены калибровочные зависимости биосенсора на основе клеток штамма *H. polymorpha* NCYC 495 *ln*, иммобилизованных на хроматографической бумаге GF/A с покрытием ацетат целлюлозой, для детекции метанола (А) и этанола (В).



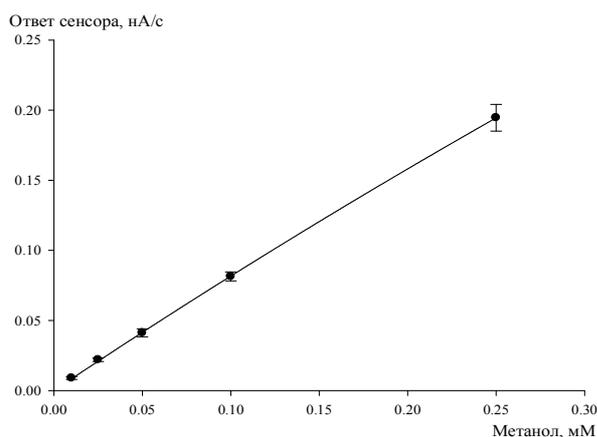
A



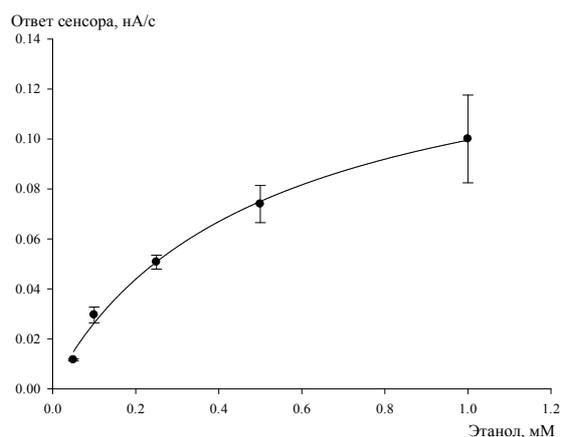
B

Рис.1.

На рис. 2 представлены калибровочные зависимости биосенсора на основе клеток штамма *H. polymorpha* NCYC 495 *ln*, иммобилизованных на хроматографической бумаге GF/A с последовательным покрытием PSS и PAH, для детекции метанола (А) и этанола (В).



A



B

Рис.2.

Таблица 1. Характеристики биосенсоров на основе клеток штамма *H. polymorpha* NCYC 495 *ln*.

Параметры биосенсора	Иммобилизация с ацетат целлюлозой		Иммобилизация с PSS и PAH	
	Метанол	Этанол	Метанол	Этанол
Общий диапазон детекции, мМ	0,01 – 0,25	0,25 – 1,00	0,01 – 0,25	0,25 – 1,00
Чувствительность (нА/с)/мМ	0,93	0,58	0,84	0,25
Время ответа, мин	2	2	2	2

## **Микроорганизмы *G. oxydans* и *P. angusta* как основа низкоселективных биорецепторов многоканального биосенсора для контроля содержания компонентов в бродильных производствах**

Арляпов В.А.

Тульский государственный университет, 300600, Тула, пр. Ленина 92,  
тел. (4872)351840, факс (4872)331305, e-mail: [chem@tsu.tula.ru](mailto:chem@tsu.tula.ru)

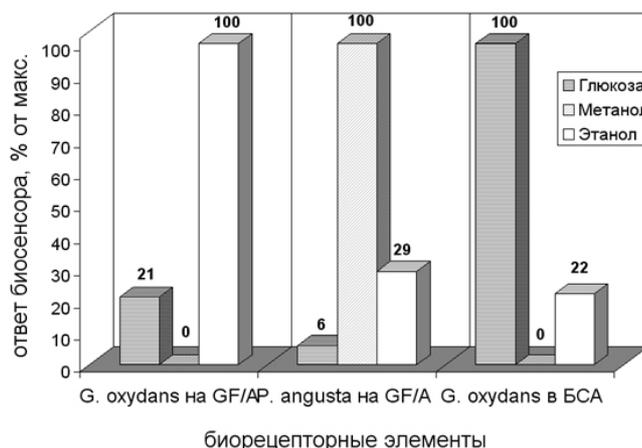
Одновременное определение содержания компонентов в ферментационных средах важно для контроля биотехнологических процессов, степени превращения сырья и качества готовой продукции [1]. Так, дифференциальная оценка содержания трех компонентов – глюкозы, метилового и этилового спиртов на различных стадиях процесса позволяет оптимизировать технологический процесс брожения и снижать материальные затраты, приводя в соответствие качество исходного сырья с качеством применяемых ферментов и дрожжевой массы [2]. Традиционные методы определения метанола и этанола либо отличаются недостаточной точностью, либо трудоемки, дороги и характеризуются длительным временем анализа, что не позволяет использовать их при постоянном мониторинге содержания указанных компонентов [3].

Один из способов селективной детекции компонентов может заключаться в получении интегральных характеристик смеси с помощью низкоселективных анализаторов и последующем использовании математических методов обработки данных с целью определения вклада, вносимого отдельными компонентами. В качестве такой интегральной характеристики можно использовать показания системы, состоящей из нескольких микробных сенсоров (биосенсоров на основе клеток микроорганизмов). К преимуществам таких биосенсоров можно отнести: невысокую стоимость, короткое время ответа, портативность, удобство в работе, а также отсутствие специальных требований к приготовлению исследуемого образца [4].

В настоящей работе рассмотрен селективный анализ трехкомпонентной смеси глюкоза-метанол-этанол. Для повышения селективности предлагается использовать набор биосенсоров с различной специфичностью и применение технологии искусственных нейронных сетей, позволяющей решать задачи, связанные с необходимостью включения в алгоритм решения процесса обучения на реальном экспериментальном материале.

В работе использована автоматизированная многоканальная биосенсорная установка амперометрического типа, интегрированная с персональным компьютером. Датчиками являются кислородные электроды с иммобилизованными клетками бактерий *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* ВКМ В-1280 и дрожжей *Pichia angusta* ВКМ У-2559. Применяемая аппаратура позволяет производить высокоточные измерения в наноамперном диапазоне токов по четырем каналам одновременно. Обработка сигнала производилась с помощью специализированного программного обеспечения ИРС (Кронас, Россия).

В ходе исследования разработана система из трех микробных сенсоров на основе иммобилизованных микроорганизмов *G. oxydans* и *P. angusta* для селективной оценки содержания глюкозы, метанола и этанола в смеси этих веществ. Иммобилизация проводилась адсорбцией на стекловолоконный фильтр Whatmat GF/A (Sigma) и включением в поперечно-сшитый бычий сывороточный альбумин (БСА).



Показано, что в зависимости от метода иммобилизации бактерии *G. oxydans* проявляют различную чувствительность к глюкозе и этанолу. Таким образом, каждый из биорецепторов проявляет различную окислительную активность по отношению к анализируемым соединениям, что позволяет использовать данную систему биосенсоров для селективного анализа смеси этих веществ.

Для анализа были использованы модельные смеси с различными концентрациями аналитов, а так же реальные образцы вин и промежуточных продуктов брожения. Полученные с помощью разработанной биосенсорной системы экспериментальные данные были обработаны с применением искусственных нейронных сетей. При создании нейронных сетей были использованы многослойные модели, содержащие 3 входных, несколько (10-100) нейронов в 1-5 скрытых слоях и 3 выходных нейрона. На вход каждой сети подавались значения ответов биосенсоров с различными рецепторными элементами, сигнал разбивался в скрытых слоях, и на выходе выдавалась концентрация глюкозы, этанола и метанола в исследуемой пробе.

Выявлены оптимальные параметры функционирования нейронной сети. Установлено, что обучение более продуктивно при использовании алгоритма Quick Propagation. Показано, что 6000 циклов является достаточным для получения минимальной ошибки. Применение искусственных нейронных сетей позволило осуществить селективный анализ в диапазоне концентраций от 0,16 до 5,00 мМ по каждому из компонентов. Показано, что при обработке данных с использованием нейронных сетей относительная ошибка определения концентрации находится в пределах 2-15% при наилучшей структуре сети.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНП 2.1.1.7789.

## Литература

1. Guemas Y., Boujtita M., el Murr N. (2000) Biosensor for determination of glucose and sucrose in fruit juices by flow injection analysis – Appl Biochem Biotechnol., 89(2-3), 171.
2. Becker T.M., Schmidt H.L. (2000) New ways of enzymatic two-substrate determinations in flow injection systems – Analytica Chimica Acta., 421(1), 7.
3. Terry L.A., White S.F., Tigwell L.J. (2005) The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry – J. Agric. Food Chem., 53., 5, 1309-1325.
4. Racek J. (1995) Cell-based biosensors – Lancaster. "Technomic Publishing Company, Inc." P. 107

## ***Yarrowia lipolytica* – продуцент лактатоксидазы**

Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г.

Институт Биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН  
142290, Московская обл., г. Пуцино, ул. Институтская, 5  
e-mail: [biryukovae05@rambler.ru](mailto:biryukovae05@rambler.ru)

Лактатоксидаза (КФ 1.1.3.X) - флавиновый фермент, катализирующий окисление лактата до пирувата с восстановлением кислорода до перекиси водорода. Фермент широко используется в медицине для определения содержания лактата в крови человека при различных патологиях: при неадекватном поступлении кислорода в ткани (острые кровотечения, тяжелая сердечная недостаточность, заболевания сердца с цианозом, острая гипоксия, сосудистый коллапс и др.) [1]. На основе лактатоксидазы созданы биосенсоры, используемые в виноделии и производстве продуктов питания [2]. Среди микроорганизмов, фермент мало распространен: он обнаружен только у бактерий родов *Pediococcus* и *Streptococcus* [3, 4], а также у грибов рода *Geotrichum* [5].

**Цель работы** – показать способность дрожжей *Y. lipolytica* к синтезу лактатоксидазы.

### **Материалы и методы исследования**

В работе изучались дрожжи *Y. lipolytica* ВКМ Y-2378 (syn. *Yarrowia lipolytica* Y-155), полученные из ВКМ ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН. Культивирование проводили на солевой среде Ридер, содержащей лактат (2%) или глюкозу (1%) в качестве единственного источника углерода и энергии.

**Получение бесклеточных экстрактов.** Клетки дважды промывали дистиллированной водой и суспендировали в 50 мМ трис-фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 0.5 мМ фенолметилсульфонилфторид – ингибитор протеаз, после чего разрушали на прессе Френча. Гомогенат центрифугировали при 105000 g 60 мин. Активность фермента определяли в осадке и супернатанте.

*Определение активности лактатоксидазы проводили двумя способами.*

1. По скорости образования перекиси водорода в 20 мМ трис-фосфатном буфере (рН 8) в присутствии о-дианизидина (0.2 мМ), пероксидазы (5 мкг/мл) и L-лактата (2мМ) на спектрофотометре «Shimadzu» ( $E_{436}=8.3 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ).

2. По скорости потребления кислорода на полярографе с помощью закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода типа Кларка.

За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующего окисление 1 мкмоль лактата в мин.

### **Результаты**

При изучении адаптации *Y. lipolytica* к различным стрессовым воздействиям (в том числе при росте клеток на несбраживаемых субстратах), было обнаружено, что при выращивании клеток *Y. lipolytica* на лактате, они способны синтезировать лактатоксидазу в экспоненциальной фазе роста. Следует отметить, что активность фермента наблюдалась также при росте *Y. lipolytica* на глюкозе при переходе клеток в стационарную фазу роста (после исчерпания глюкозы).

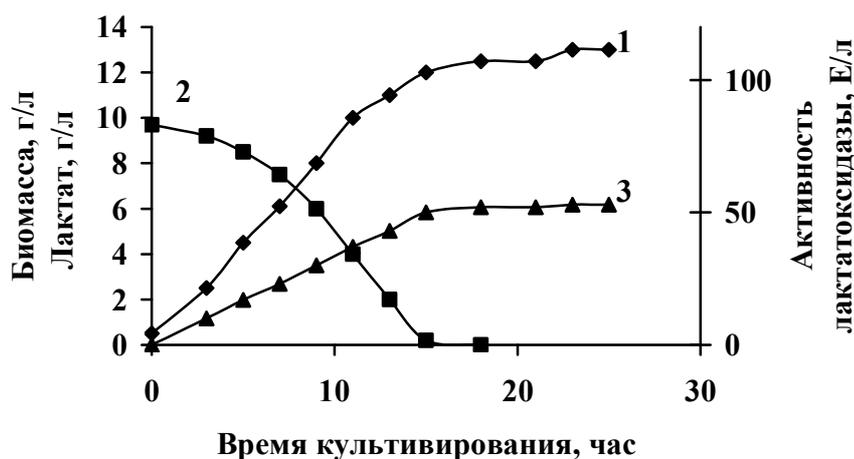


Рис. 1. Биосинтез лактатоксидазы в процессе роста *Y. lipolytica* на лактате. 1 – накопление биомассы, 2 - убыль лактата, 3 – активность лактатоксидазы.

Была изучена ультраструктура клеток *Y. lipolytica* при росте на лактате. По данным электронной микроскопии у клеток, выращенных на лактате (2%), в отличие от контрольного варианта (клетки, выращенные на глюкозе, 1%), отмечалось увеличение численности глобулярных структур на цитоплазматической мембране, увеличение размера митохондрий, периферийное расположение более крупных пероксисом. Кроме того, клетки, выращенные на лактате, отличались более высокой активностью каталазы (в 3-4 раза) по сравнению с клетками, выращенными на глюкозе. Было обнаружено, что фермент в основном находится в растворимой фракции клеток (см. Таблица 1).

Таблица 1. Распределение активности лактатоксидазы по фракциям

Фракция	Общая активность, Е	Содержание лактатоксидазы, %
Гомогенат	400	100
Мембранная фракция	15	4
Растворимая фракция	385	95

В дальнейшем планируется оптимизация условий биосинтеза лактатоксидазы *Y. lipolytica*, разработка метода выделения и очистки фермента, а также изучение его физико-химических свойств.

#### Литература:

1. *Z. Clin* (1972) – Chem. and Clin. Biochem., 8, 658.
2. *Xu Jing-Juan, Zhao Wei, Luo Xi-Liang, Chen Hong-Yuan* (2005) – Chem. Commun., 6, 792–794.
3. *Xu P., Yano T., Yamamoto K., Suzuki H., Kumagai H.* (1996) – Appl. Biochem. Biotechnol., 56, 3, 277-288.
4. *Masanori Seki, Ken-ichiro Iida, Matsumosa Saito, Hiroaki Nakayama, Shin-ichi Yoshida* (2004) – J. Bacteriol., 186, 7, 2046-2051.
5. *Куплетская М.Б., Сухачева М.В., Кураков А.В., Непрусов А.И.* (2007) – Прикладная биохимия и микробиология, 43, 2, 199-202.

## Биотехнологическое получение L(+)-молочной кислоты

Бобкова М.Д., Сингирцев И.Н.

ЗАО «Биоамид», 410033 Россия, Саратов, Международная 27,  
e-mail: [bioamid@pochta.ru](mailto:bioamid@pochta.ru)

По прогнозам экспертов, мировое потребление пластмасс к 2010 году увеличится с 180 до 258 миллионов тонн. В этой связи использование биоразлагаемых полимеров, полученных из возобновляемого сырья, послужит решением многих экологических и технологических проблем.

Перспективной заменой традиционных пластиков становятся полилактаты (ПЛ), так как они поддаются обработке на обычном оборудовании и позволяют получать биопластмассы, имеющие разные технические характеристики [1].

Мономером для производства ПЛ служит молочная кислота, которую получают ферментацией углеводов (глюкозы, сахарозы, лактозы) с помощью бактерий родов *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* и *Streptococcus*, а также некоторых штаммов грибов, например *Rhizopus oryzae* [2].

Целью настоящей работы является оптимизация питательной среды для гомоферментативных молочнокислых бактерий на примере штамма *Lactococcus lactis* Г7.

Особенностями конструктивного метаболизма гомоферментативных молочнокислых бактерий являются слабо развитые биосинтетические способности. Это выражается в том, что для построения клеточных структур они нуждаются в готовых аминокислотах, а для функционирования ферментативных систем - в факторах роста (витамины группы В, пурины, пиримидины) [3]. В качестве энергетического субстрата выступают углеводные компоненты среды, которые конвертируются в чистую L(+)-молочную кислоту с выходом до 98%.

Традиционно для выращивания молочнокислых бактерий используют дрожжевой экстракт (ДЭ), дрожжевой автолизат (ДА), кукурузный экстракт (КЭ), молочную сыворотку, томатный сок и другие субстраты.

При ферментации штамма Г7 на среде, содержащей 150 г/л сахара и 50 г/л ДА, за 5 суток образовывалось 30-110 г/л молочной кислоты.

Было установлено, что для удовлетворения потребности в факторах роста достаточно 0,5 г/л ДЭ. Возможность использования бактериями штамма Г7 в качестве ростового субстрата продуктов ферментативного гидролиза различных веществ проверяли при культивировании микроорганизмов в течение 5 суток на среде, содержащей 150 г/л сахара. Концентрация ростового компонента в среде культивирования составляла 50 г/л. В случае использования дрожжевого гидролизата ДЭ не добавляли. Результаты этих опытов представлены в таблице:

Ростовой субстрат	Концентрация образовавшейся молочной кислоты, г/л
Гидролизат дрожжей	30-50
Гидролизат казеина	40-60
Гидролизат рыбной муки	>110

При выращивании бактерий на среде с содержанием 150 г/л сахара, 0,5 г/л ДЭ и продуктов кислотного гидролиза субстратов в количестве 9 г/л за 4 суток роста молочная кислота образовывалась в следующих концентрациях:

Ростовой субстрат	Концентрация образовавшейся молочной кислоты, г/л
Гидролизат дрожжей	>110
Гидролизат казеина	>110
Гидролизат рыбной муки	70

Кислотный гидролиз рыбной муки, казеина и дрожжевых клеток позволял получать субстраты, которые удовлетворяли ростовые потребности штамма *Lactococcus lactis* Г7. В случае с дрожжами и казеином получался стабильный высокий выход молочной кислоты.

При ферментативном гидролизе дрожжевых клеток и казеина происходил частичный распад белков, что объясняло более низкие концентрации полученной молочной кислоты. Гидролиз рыбной муки проходил более полно, что благоприятно отражалось на продукции молочной кислоты.

Таким образом, выявлена возможность получать L(+)-молочную кислоту в высоких концентрациях при использовании в качестве ростового субстрата дрожжей, рыбной муки или казеина.

#### Литература:

1. Фомин В.А., Гузев В.В. (2001) Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования – Пластические массы, 2, 42–46.
2. Hofvendal K., Hahn-Haegerdal B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources – Enzyme Microb. Technol., 26, 87–107.
3. Практикум по микробиологии. Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

## Выделение токсинсвязывающего белка из кишечного эпителия личинок мучного хрущака *Tenebrio molitor*

Булущова Н.В., Залунин И.А.

ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1. e-mail: [zalunin@genetika.ru](mailto:zalunin@genetika.ru)

Одним из основных вредителей запасов является мучной хрущак (*Tenebrio molitor*), который во всём мире уничтожает значительную часть запасов зерна и муки. По понятным причинам для борьбы с этим насекомым не могут быть применены химические инсектициды. Поэтому основной упор делается на создание биологических средств борьбы. На сегодняшний день наиболее применимыми биоинсектицидами являются препараты на основе дельта-эндотоксинов (Сгу-белков), продуцируемых бактериями *Bacillus thuringiensis* (BT). Также создаются трансгенные растения, несущие ген энтомоцидного белка. Специфичность Сгу-белков определяется взаимодействием с токсин-связывающими белками (рецепторами), экспонированными в апикальной мембране кишечника чувствительного насекомого. Для токсинов, активных против гусениц и личинок комаров, в качестве рецепторов выступают: аминопептидаза N, кадгериноподобные белки, щелочная фосфатаза. Для личинок *T. molitor* высокой токсичностью обладает эндотоксин Сгу3Аа, продуцируемый подвидом *tenebrionis* BT. Однако про рецепторы этого белка у *T. molitor* какие-либо данные отсутствуют.

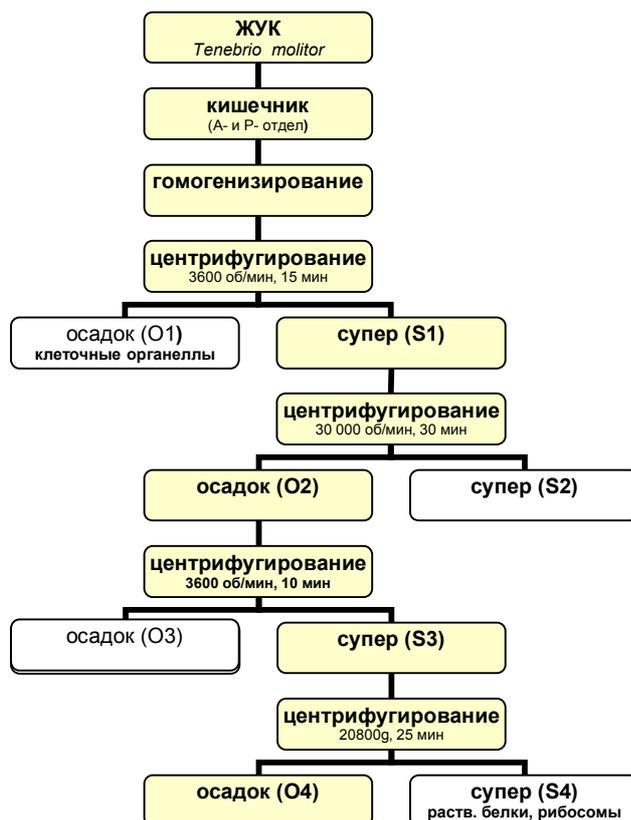
Нашей первой задачей было выявить мембранные белки *T. molitor*, специфически связывающиеся эндотоксином Сгу3Аа. Для этого был получен препарат апикальных мембран кишечного эпителия этого насекомого. Степень очистки мембран определялась путем измерения активности Leu-аминопептидазы, маркера апикальной мембраны кишечника насекомого. Из таблицы 1 видно, что препарат был очищен в 120 раз.

Таблица 1. Измерение Leu-аминопептидазной активности во фракциях, полученных в ходе выделения апикальных мембран.

	Активность ед/мин мг <sub>б</sub>	Суммарная активность, (ед)
<b>гомогенат</b>	<b>0,054</b>	<b>7,97</b>
супер 1	0,14	6,49
осадок 1	0,12	2,90
супер 2	0,02	0,77
осадок 2	0,8	4,5
супер 3	3	2,78
осадок 3	0,68	1,8
супер 4	0,25	0,12
<b>осадок 4*</b>	<b>6,7</b>	<b>2,4</b>

\* - осадок 4 является препаратом апикальных мембран

Схема выделения апикальных мембран



Полученный препарат был подвергнут электрофорезу с последующим электропереносом, и нитроцеллюлозные реплики инкубировали с биотинилированным токсином. Связавшийся токсин визуализировали с помощью биотин-стрептавидиновой системы. Специфическое связывание с Cту3А показывали белки с молекулярной массой 95 и 60 кДа (рис. 1).

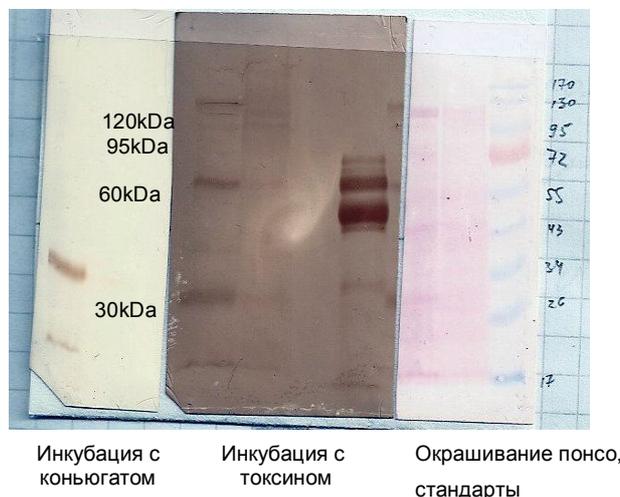


Рис.1. Результат лиганд-блоттинга

Для очистки токсинсвязывающего белка нами были синтезированы аффинные сорбенты, в которых к сефарозе были пришиты исходный эндотоксин Cту3Аа (65 кДа) или его растворимый фрагмент (49 кДа), сохраняющий биологическую активность (см. Таблица 2).

Таблица 2. Типы сорбентов и результаты аффинной хроматографии

Тип сорбента	Концентрация лиганда, мг/мл	Белки, элюированные с колонки
Cту 3А <sub>65kDa</sub> – сефароза	2	-
Cту 3А <sub>65kDa</sub> – аминогексил агароза	1	-
Cту 3А <sub>49kDa</sub> – аминогексил агароза	1	~ 95kDa, ~ 65kDa, ~ 60kDa

Именно при хроматографии на последнем сорбенте нам удалось выделить белки с молекулярной массой 95, 65 и 60 кДа, способные взаимодействовать с Cту3А в экспериментах по лиганд-блоттингу. Интересно, что эти полосы не реагировали с биотинилированными БСА и эндотоксином Cту11А, токсичным для личинок комаров, но не действующим на *T. molitor* (рис. 2).

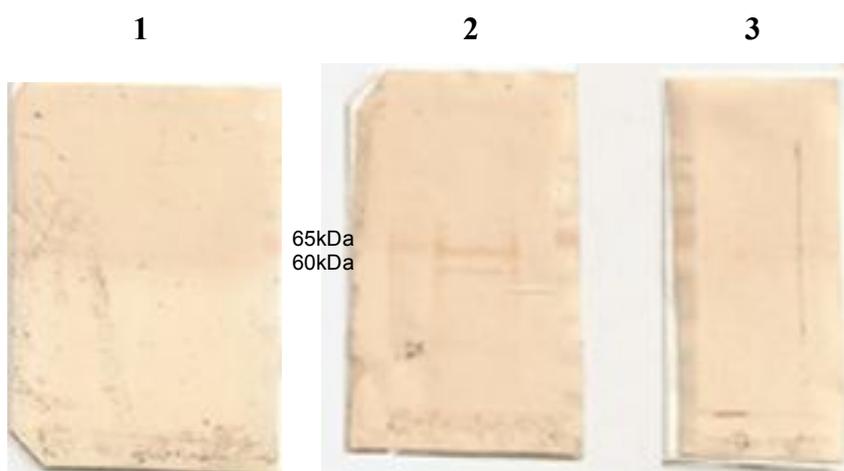


Рис. 2. Изучение специфичности связывания выделенных мембранных белков с :  
1 - BSA, 2 - токсином Cry 3A, 3 - токсином Cry11A

Полученные данные позволяют считать, что с помощью аффинной хроматографии нами были выделены белки мучного хрущака, специфически связывающиеся с Cry3A, возможные кандидаты в рецепторы этого токсина.

## Разработка методов получения антимикробных пептидов

Василевский А.А., Гришин Е.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;  
e-mail: [avas@ibch.ru](mailto:avas@ibch.ru)

Стремительный рост числа структурно новых антибиотиков, вводимых в клиническую практику, наблюдавшийся в середине прошлого столетия, сменился длительным инновационным кризисом, который продолжается и сегодня. Распространены случаи устойчивости целого ряда патогенов человека практически к любому из применяемых лекарств. По-видимому, принципиально новым классом природных антибиотиков, которые найдут применение в клинике, являются т.н. антимикробные пептиды (АМП), продуцируемые высшими организмами для защиты от инфекций. Эти соединения являются неотъемлемой частью системы врожденного иммунитета, характерного практически для всех многоклеточных, а не только для высших позвоночных.

Способность быстро убивать клетки-мишени, широкий спектр действия, активность в отношении штаммов, резистентных к другим антибиотикам, а также относительная трудность в селекции устойчивых мутантов, позволяют рассматривать АМП в качестве основы для создания нового поколения эффективных лекарств. Однако для успешной коммерциализации АМП необходимо решить проблему их промышленного получения. Химический синтез АМП является экономически невыгодным, в сравнении с обычными антибиотиками цена синтетических АМП выше в сотни раз.

Биотехнология служит альтернативой химическому синтезу. Лекарства белковой и пептидной природы, как правило, производят с использованием бактериальных систем экспрессии, например, в *Escherichia coli*. В случае АМП их химическая природа и биологическая активность являются очевидными препятствиями такому подходу. Для цистеин-богатых АМП возникает проблема корректного формирования дисульфидных связей. Линейные АМП являются мишенями бактериальных протеаз. Биологическая активность АМП может привести к гибели клеток-продуцентов.

Целью настоящей работы являлось получение в *E. coli* различных по источнику, химическому строению и активности АМП. В качестве объектов исследования были выбраны АМП с наиболее выраженной антимикробной активностью, выделенные и охарактеризованные нами ранее (табл. 1).

Таблица 1. Объекты исследования

пептид	источник	длина, остатков	заряд (pH 7)	число S-S-связей	активность
Ltc 2a	яд паука <i>Lachesana tarabaevi</i>	26	+9	0	антибактериальная
SmAMP-1.1a	семена мокрицы <i>Stellaria media</i>	35	+2	3	антифунгальная
SmAMP-2.2a		30	+3	3	антифунгальная
WAMP-1a	семена пшеницы <i>Triticum kiharae</i>	44	+3	5	антифунгальная

Ltc 2a – сравнительно короткий линейный катионный пептид, активный в т.ч. и в отношении *E. coli*. Пептиды растительного происхождения SmAMP-1.1a, SmAMP-

2.2a и WAMP-1a, напротив, характеризуются наличием большого числа остатков цистеина и проявляют активность по отношению к грибам-патогенам растений. Таким образом, на примере данных пептидов мы столкнулись со всеми перечисленными трудностями получения АМП в бактериях.

Для нейтрализации возможного токсического эффекта продуцируемых пептидов, для их стабилизации и увеличения уровня экспрессии их генов используют различные вспомогательные элементы. На первом этапе мы использовали один из самых распространенных подходов – получение искомым пептидов в виде химеры с собственным белком *E. coli* тиоредоксином. Было показано, что реализуются высокий уровень экспрессии химерных генов, растворимость продукта и правильное расположение дисульфидных связей. Химерные белки содержали также последовательность, обеспечивающую возможность очистки с помощью аффинной хроматографии и сайт протеолиза для отделения искомого продукта. Конечной стадией получения пептидов служила высокоэффективная жидкостная хроматография. В результате достигнут выход рекомбинантных пептидов 3–15 мг/л бактериальной культуры (табл. 2).

С целью увеличения выхода дисульфид-содержащих пептидов планируется отработать существующую методику, выявить оптимальные условия экспрессии. В случае Ltc 2a планируются следующие модификации: (а) использование нерастворимого белка-носителя и получение химеры в виде телец включения; введение в состав химеры (б) природной последовательности предшественника, нейтрализующей активность зрелого пептида или (в) тандемных повторов Ltc 2a. Получены соответствующие экспрессирующие векторы, проведена оценка их эффективности (табл. 2).

Таблица 2. Результат исследований

пептид	выход, мг/л культуры	
	полученный на данный момент	ожидаемый, после отработки условий
Ltc 2a	3	15
SmAMP-1.1a	15	30
SmAMP-2.2a	15	30
WAMP-1a	8	20

Полученный в ходе выполнения работы выход искомым пептидов является достаточно низким с точки зрения производства, однако, по нашему мнению, может быть существенно увеличен. Результат работы используется для проведения всесторонних структурных (ЯМР) и функциональных исследований АМП, сайт-направленного мутагенеза, получения изотопно-меченных пептидов.

#### Литература:

1. Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Feofanov A.V., Surovoy A.Y., Karpunin D.V., Grishin E.V. (2006) Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. – J. Biol. Chem., 281(30), 20983-20992.
2. Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Grishin E.V. (2008) Antimicrobial peptide precursor structures suggest effective production strategies. – Recent Pat. Inflammation Allergy Drug Discovery, 2(1), 58-63.
3. Shlyapnikov Y.M., Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. (2008) Bacterial production of latarcin 2a, a potent antimicrobial peptide from spider venom. – Protein Expression Purif., 60(1), 89-95.

## Продукция нефтеокисляющими бактериями индолилуксусной кислоты и биосурфактантов

Волченко Н.Н., Кочина О.В.

Кубанский государственный университет, 350040 Краснодар, Ставропольская 149,  
e-mail: [volchenko.n@gmail.com](mailto:volchenko.n@gmail.com)

Одним из приоритетных направлений современной биотехнологии является экологическое. Заметный сегмент в отрасли занимает биоремедиация нефтезагрязнённых почв и грунтов. Как правило, она включает в себя несколько этапов: в процессе микробной очистки, штаммы-деструкторы разлагают нефтепродукты, снижая их концентрацию до экологически приемлемых норм; на стадии фиторемедиации, высеваются нефтеустойчивые растения, ускоряющие разложение остаточных концентраций углеводородов и восстановление плодородия. Повысить эффективность ремедиации можно за счёт растительно-микробных взаимодействий – микроорганизмы способны выделять соединения-фитостимуляторы; растения, в свою очередь, обеспечивают более комфортные условия существования бактерий в прикорневой зоне. Одним из наиболее известных фитогормонов является индолил-3-уксусная кислота (ИУК), продуцируемая широким кругом микроорганизмов. С биотехнологической точки зрения, перспективной представляется возможность продукции ИУК нефтеокисляющими микроорганизмами в процессе деструкции углеводородов. В этом случае в процессе микробного этапа биоремедиации достигалось бы не только снижение концентрации поллютанта в почве, но и стимуляция растений для этапа фиторемедиации.

Целью настоящего исследования являлся поиск бактерий - деструкторов углеводородов, способных к синтезу фитогормона ауксина. Отбор штаммов вёлся и по признаку продукции биосурфактантов – биогенных ПАВ, позволяющих микроорганизмам увеличивать биодоступность нефтепродуктов. Исследовалась коллекция нефтеокисляющих бактерий Кубанского государственного университета (36 изолятов) и неидентифицированные ризосферные культуры (17 изолятов). Все исследованные культуры являлись деструкторами нефтепродуктов, наиболее активные штаммы использовались в работах по биоремедиации [1], отмечено положительное влияние некоторых культур на рост растений в нефтезагрязнённой почве [2]. Все культуры выращивались на минимальной среде с углеводородами как единственными источниками углерода и энергии. В результате проведённого скрининга продукция ИУК была отмечена у 25 культур, 12 из которых путём кластерного анализа были отобраны как наиболее активные. Культуры принадлежали к родам *Rhodococcus* (7 штаммов), *Gordonia* (3 штамма), *Dietzia* (1 штамм), *Arthrobacter* (1 штамм), уровень продукции ауксина у них составлял 9-12 мкг/мл. Оценка поверхностно-активных свойств культур показала, что часть из них являются продуцентами биосурфактантов – отмечено снижение уровня поверхностного натяжения (ПН) и появление эмульгирующей активности (ИЭ – индекс эмульгации). Так, например, у штамма *Gordonia sp.* Z8 уровень поверхностного натяжения снижался до 40,6 мН/м при эмульгирующей активности 9 %, продукция ИУК составляла 9,18 мкг/мл, у штамма *R. erythropolis* F1 ПН и ИЭ соответственно составляли 44,6 мН/м и 15 %, при выходе ИУК 11,78 мкг/мл, у *Arthrobacter sp.* F6 – соответственно 48.1 мН/м, 46 % и 11,28 мкг/мл. Динамика продукции ауксина и поверхностно-активных свойств представлены на примере штамма *Rhodococcus erythropolis* B2 (ВКМ Ас-2017 D) на рис. 1.

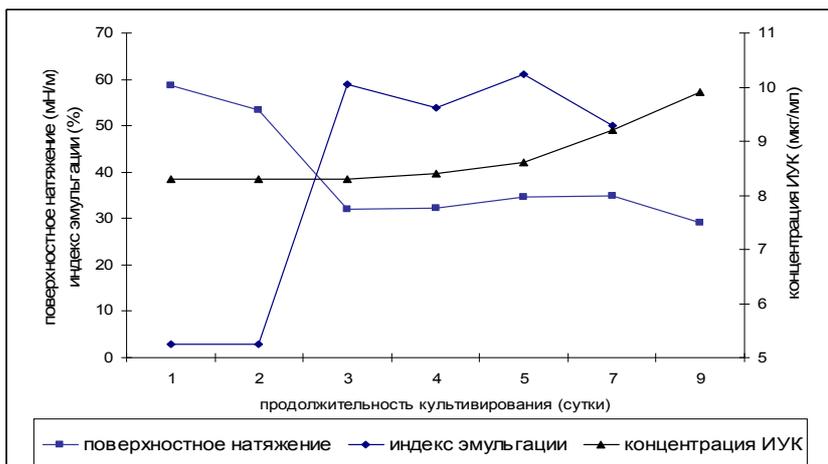


Рис. 1. Динамика продукции индолилуксусной кислоты и уровня поверхностного натяжения в жидкой культуре штамма *Rhodococcus erythropolis* B2.

Выход фитогормона у данного штамма составляет 8 - 10 мкг/мл. Данный уровень продукции является относительно небольшим среди известных продуцентов ИУК. Так, например, в работе [3] продукция ИУК штаммом *Azospirillum* составляла более 20 мкг/мл на среде с малатом в присутствии нефти. Однако, следует отметить, что, как правило наработка ауксина производится на богатых органических средах, в том числе с триптофаном, как предшественником. В нашем случае ауксин синтезировался на минимальной минеральной среде с углеводородом в качестве единственного источника углерода и энергии, что является перспективным технологическим признаком. Снижение уровня поверхностного натяжения среды роста и появление эмульгирующей активности свидетельствует о продукции биосурфактантов данным штаммом. Они были выделены химически и продемонстрировали следующие свойства – снижали уровень поверхностного натяжения до 44,2 мН/м, создавали устойчивую эмульсию с углеводородом типа “масло в воде”. Выделение клетками биоэмульгаторов способствует диспергированию нефтепродуктов, что повышает уровень их деструкции микрофлорой и ускоряет очистку почв.

В результате исследования отобраны нефтеокисляющие бактерии, способные к продукции фитогормона ауксина и биогенных сурфактантов в процессе деструкции углеводов. Сочетание способности к деструкции нефтепродуктов и синтезу на их основе биосурфактантов и фитостимуляторов делает данные штаммы перспективными агентами для работ по биоремедиации.

#### Литература:

1. Карасева Э.В., Гирич И.Е., Худокормов А.А., Алешина Н.Ю., Карасев С.Г. (2005) Биоремедиация черноземной почвы, загрязненной нефтью – Биотехнология, 2, 67-72.
2. Волченко Н.Н., Карасёва Э.В. (2006) Скрининг углеводородокисляющих бактерий-продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама – Биотехнология, 2, 57-62.
4. Турковская О.В., Муратова А.Ю. Биодegradация органических поллютантов в корневой зоне растений – Молекулярные основы взаимодействия ассоциативных микроорганизмов и растений. Под. ред. Игнатова В.В. Москва. Наука. 2005. С.180-208.

## **Разработка молекул-носителей для целевых пептидов как основа создания новых безопасных вакцин и наработки терапевтических белков**

Вячеславова А.О.<sup>1,2</sup>, Голденкова-Павлова И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д.3, e-mail: irengold@vigg.ru*

<sup>2</sup> *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра генетики, 199899, г. Москва, Воробьевы горы, e-mail: alisa.v.o@gmail.com*

Белки, ферменты и другие продукты бактерий нашли широкое применение в биотехнологии, в том числе и в области медицинской биотехнологии в качестве терапевтических средств. В последнее время во многих работах, посвященных разработки технологий создания новых вакцинных препаратов, продемонстрирована необходимость разработки и использования альтернативных технологий создания вакцин для того, чтобы преодолеть ограничения в функциональных, временных и материальных возможностях вакцин. Для создания новых безопасных вакцин и наработки терапевтических белков мы предложили использовать стратегию создания гибридных белков, в которых целевой пептид является внутренним модулем молекулы-носителя. У исследователей в настоящее время имеет очень ограниченный арсенал таких молекул-носителей, в связи с этим, поиск и разработка новых молекул-носителей для инженерии эффективных субъединичных вакцин являются весьма актуальным.

В качестве молекулы-носителя целевых пептидов нами использована термостабильная лихеназа *Clostridium thermocellum*. Выбор этого фермента обусловлен его свойствами, а именно высокой активностью и термостабильностью, а также наличием хорошо разработанных простых и чувствительных методов определения активности этих ферментов. Эти свойства позволяют достаточно легко проводить очистку этих ферментов, а также определять количество и сохранность созданных препаратов.

Для выбора в молекуле лихеназы областей, в которые можно проводить достройки пептидов, первоначально, методами *in silico* анализа на поверхности лихеназы были определены петлевые структуры, которые были использованы в дальнейших исследованиях. В качестве экспериментального подхода, для выбора в молекуле лихеназы областей, в которые возможно было бы производить внутренние достройки, а также для расширения арсенала репортерных молекул-носителей, мы использовали стратегию конструирования «циклически перестановленных» белков. Данная стратегия основана на получении модифицированных ферментов, у которых С- и N-концевые области исходного белка соединяются линкером, а новые концевые области создаются в положениях каждого из исследуемых элементов белковой глобулы. В ходе исследования были определены функциональные элементы полипептидного остова, которые важны для корректной укладки, стабильности и каталитической активности исследуемых ферментов, и получен набор репортерных молекулы-носители, сконструированных на основе одного термостабильного фермента лихеназы, которые сохранили основные биохимические свойства – термостабильность и активность. Полученные варианты ферментов были

использованы для интеграции в них последовательностей пептидных эпитопов (вируса верхних дыхательных путей, туберкулеза CFP7 и ESAT6). Было показано, что в составе гибридных белков, в которых последовательности пептидов, имеющих различную длину и структуру, встроены в последовательность разных вариантов термостабильной лихеназы в виде внутреннего модуля, лихеназа сохраняет высокую активность и термостабильность, а исследуемые пептиды - свои свойства.

Известно, что существуют трудности в использовании прокариот как продуцентов терапевтических белков, таких как, например, интерфероны. Одна из них связана с тем, что интерферон в бактериальных клетках образуется в форме нерастворимых агрегатов, что не позволяет использовать бактерии как эффективные продуценты. Мы предположили, что поскольку лихеназа при синтезе в бактериальных клетках образуется в растворимой форме, возможно, и интерферон как внутренняя часть гибридного белка также будет синтезироваться и накапливаться в растворимой форме. Для того, чтобы показать, что лихеназа может быть использована как белок-носитель для наработки терапевтических препаратов, в частности, интерферонов, был сконструирован гибридный ген на основе лихеназы, в котором последовательность, кодирующая интерферон- $\alpha$ A2, интегрирована в виде внутреннего модуля. В клетках бактерий были экспрессированы: нативный (Inf) и гибридный (AIC) гены интерферона в составе вектора pET, который способен выносить целевой белок в культуральную среду. Далее, было проведено фракционирование белковых компонентов, а именно, были получены фракции растворимых белков, фракция клеточного дебриса и фракция белков из культуральной среды. Белковые препараты всех фракций были проанализированы методом Вестерн-блот гибридизации с использованием специфических антител к интерферону- $\alpha$ A2. Полученные результаты показали, что гибридный белок AIC выявлен во фракции клеточного дебриса, а также во фракции белков, полученных из культуральной среды, и небольшое количество белка выявлено в растворимой фракции, в отличие от нативного интерферона. Нативный интерферон выявлен только во фракции клеточного дебриса.

Таким образом, нами разработаны новые белки-носители для целевых пептидов, которые имеют ряд преимуществ: подходят для экспрессии коммерчески необходимых целевых полипептидов в различных системах экспрессии, выдерживают различные размеры полипептидов и пептидов, а также тандемные повторы целевых полипептидов, могут использоваться как высокоэффективный скрининговый инструмент. При этом, новые белки-носители могут стать основой для разработки современных и эффективных вакцин, желательными чертами которых являются: наличие известной и контролируемой генетической композиции; возможность экспрессии как малых пептидов, так и больших полипептидов; возможность для экспрессии в различных системах (бактерии, дрожжи, культура клеток млекопитающих, вирусные вектора, ДНК вектора, трансгенные растения и вектора для транзientной экспрессии).

## Использование метода вычитающего рестрикционного фингерпринтинга для типирования штаммов чумного микроба

Гаева А.В., Булгакова Е.Г.

Федеральное государственное учреждение здравоохранения  
Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб».  
410005, г. Саратов, ул. Университетская, д.46.  
e-mail: [microbe@san.ru](mailto:microbe@san.ru), [www.microbe.ru](http://www.microbe.ru)

Вид *Yersinia pestis* представлен пятью подвидами, различающимися по вирулентности и эпидемической значимости. Поэтому для определения потенциальной опасности изолированного штамма возбудителя чумы большое значение имеет выяснение его происхождения. Подвидовая классификация чумного микроба основана на фенотипических характеристиках и географическом происхождении штаммов. Несмотря на то, что для типирования штаммов чумного микроба к настоящему времени использовались различные методы молекулярного типирования (макрорестрикционный анализ, риботипирование, IS-типирование, VNTR – типирование и т.д.), ни один из этих методов не стал генетическим подтверждением подвидовой классификации чумного микроба. Поэтому поиск такого метода остается актуальным. Не менее важно и практическое значение методов молекулярного типирования. Их применение позволяет дифференцировать штаммы, обусловившие конкретную вспышку чумы от других штаммов того же вида или подвида, проследить распространение отдельного бактериального штамма, выявить источник инфицирования, установить исходный очаг. Одним из методов, позволяющих проводить типирование на основе «анонимной» ДНК бактерий является метод вычитающего рестрикционного фингерпринтинга (ВРФ), разработанный на модели *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* [1, 2]. По данным авторов, метод позволяет дифференцировать близкородственные виды бактерий, выявлять внутривидовые различия, распознавать изоляты и субклоны. Метод ВРФ основан на обработке геномной ДНК двумя ферментами рестрикции, последующим мечением концов фрагментов нерадиоактивными метками, избирательном захвате и удалении биотин меченых фрагментов ДНК стрептавидин-магнитными частицами. Разрешающая способность этого метода для штаммов чумного микроба еще не изучена.

Цель настоящей работы – апробация метода вычитающего рестрикционного фингерпринтинга для типирования штаммов чумного микроба разного происхождения и получение их молекулярных портретов с помощью данного метода.

В работе использовали 36 штаммов чумного микроба пяти подвидов, изолированных из различных природных очагов. Выделение ДНК проводили стандартным лизоцим-фенольным методом для грамотрицательных бактерий [1]. Образцы ДНК обрабатывали согласно протоколу, предложенному *Terletski V.* с соавт. [1].

Определение количества сайтов узнавания для ферментов вычитания (26 ферментов) на известных нуклеотидных последовательностях геномов штаммов *Y. pestis* биовара *Orientalis* (CO92), биовара *Medievalis* (KIM) проводили с помощью компьютерной программы “Gene Runner v.3.00”. Полученные картины фингерпринтов обрабатывали в редакторе Adobe Photoshop 4.0.

На первом этапе работы проведен поиск комбинации ферментов детекции и вычитания, дающей высокий индекс различия для штаммов чумного микроба.

Теоретически близкое и приемлемое для разделения и анализа количество фрагментов дают комбинации ферментов *EcoRI-Cfr10I*, *EcoRI- PaulI*, *EcoRI- MluI*, *EcoRI- Eco52I*, *EcoRI- Kpn2I*, где «детектирующий» фермент- *EcoRI*, «вычитающие» ферменты - *Cfr10I*, *PaulI*, *MluI*, *Eco52I*, *Kpn2I*. Данные пары ферментов тестировали на 6 референтных штаммах основного и неосновных подвидов. Со всеми парами ферментов выявлены внутривидовые различия в количестве и расположении детектируемых полос, что послужило основанием для проведения дальнейших экспериментов на расширенной выборке штаммов.

Наиболее демонстративные отличия выявлены в диапазоне 400 – 2000 п.н. с использованием комбинации ферментов *EcoRI-PaulI*. Полученные картины фингерпринтов, обработанные в редакторе Adobe Photoshop 4.0, представлены в виде схемы (рис. 1).

Для штаммов основного подвида (представлены 9 изолятами) выявлены различия молекулярных портретов, что позволило сформировать группу из девяти геновариантов, причем каждый геновариант соответствовал отдельному природному очагу. У штаммов алтайского подвида(А) выявлены два типа ВРФ – паттернов: один геновариант представлен штаммами из Горно-Алтайского очага, второй геновариант - штаммами из Монголии. У штаммов улегейского(У) и кавказского(К) подвида было также показано наличие двух геновариантов, каждый из которых соответствовал конкретному природному очагу. Штаммы гиссарского(Г) подвида и таласской группы(Т) показали мономорфность ВРФ – паттернов и образовывали по одному геноварианту.

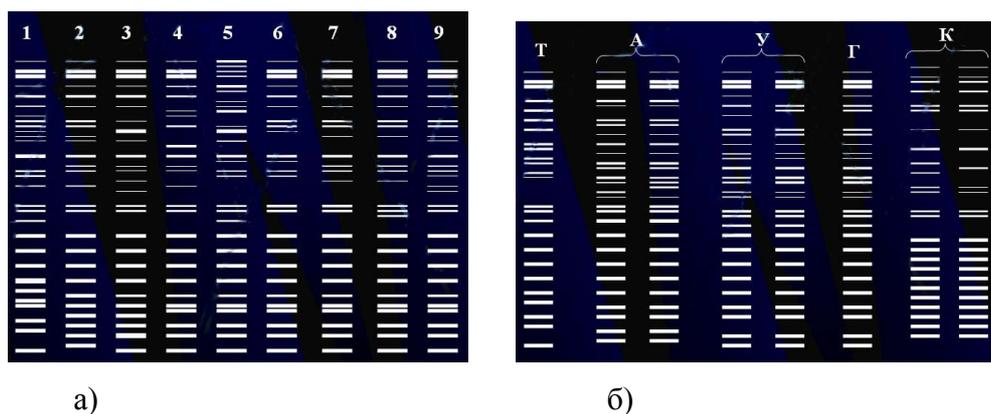


Рис. 1. Схемы распределения паттернов: а) штаммы основного подвида, б) штаммы неосновных подвида

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования метода вычитающего рестрикционного фингерпринтинга для дифференциации патогенных иерсиний, выявления внутривидовых различий чумного микроба и эволюционных связей подвида, а также определения привязки штаммов к природным очагам. Метод подтверждает обоснованность деления штаммов чумного микроба на подвиды и может послужить основой для совершенствования классификации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00100-а, ОФИ (№ 06-04-08152).

#### Литература:

1. Terletski V., Schwartz S., Carnwath J. (2003) – BioTechniques., 34, 304-313.
2. Terletski V., Michael G.B., Schwartz S. (2004) – FEMS Immunol. Med. Microbiol, 41, 1-8.

## **Аборигенная микрофлора замазученных сточных вод в практике охраны водных экосистем от нефтяных углеводородов**

Гальперина А.Р., Сопрунова О.Б.

*Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Астраханский государственный технический университет. 414025 г. Астрахань, ул. Татищева, 16, e-mail: [alina\\_r\\_s@rambler.ru](mailto:alina_r_s@rambler.ru)*

Разложение нефти и нефтепродуктов в естественных условиях – процесс биогеохимический, в котором главное значение имеет функциональная активность комплекса микроорганизмов: автотрофов и гетеротрофов, аэробов и анаэробов, хемосинтетиков и фотосинтетиков, являющихся организмами различных трофических уровней. В природных экосистемах распространены взаимодействия по линии энергетического субстрата, катаболитической синтрофии [1].

Особую проблему биологического разрушения представляют биологически "жесткие" нефтепродукты, представляющие собой продукты переработки нефти, такие как мазут, битум, асфальт, минеральные масла, получаемые из тяжелых нефтяных фракций. Исследования данного вопроса немногочисленны и они свидетельствуют о том, что нефтепродукты значительно медленнее подвергаются биологическому разрушению.

Объектами настоящих исследований являлись замазученные сточные воды резервуара-накопителя одной из нефтебаз, расположенных в черте г. Астрахани. Гидрохимические анализы сточных вод выполняли согласно требованиям ГОСТ.

Выделение аборигенных микроорганизмов различных физиологических групп из замазученных сточных вод осуществляли методом Коха [2] на твердые питательные среды (агары): мясо-пептонный (МПА), пептонный, разведенный в 10 раз (МПА/10); Селибера; Чапека; голодный; крахмало-аммиачный; для нефтеокисляющих микроорганизмов. Для выделения аммонифицирующих, нитрифицирующих, денитрифицирующих, азотфиксирующих, сульфатредуцирующих микроорганизмов, тионовых бактерий и фотосинтезирующих серобактерий проводили посев методом предельных разведений [2] на жидкие питательные среды: Виноградского для нитрификаторов I и II фазы, Гильтая; Виноградского для свободноживущих анаэробных азотфиксаторов и Эшби для свободноживущих аэробных азотфиксаторов; Таусона; для тионовых бактерий и Ван-Ниля; мясо-пептонный бульон.

В ходе определения гидрохимических показателей установлено, что для сточных вод поверхностного горизонта резервуара-накопителя отмечается превышение ПДК для рыбохозяйственных водоемов: общая минерализация ( $2920 \text{ мг/м}^3$ ) – 3 ПДК хлорид-ионы ( $1420 \text{ мг/м}^3$ ) – 5 ПДК. Гидрокарбонаты содержатся в количестве  $1530 \text{ мг/м}^3$ , рН среды – 8,0 (слабощелочная).

При изучении микрофлоры сточных вод резервуара-накопителя установлено, что в ее составе содержатся различные физиологические группы микроорганизмов (рис 1), обладающие различными метаболическими особенностями и способные осуществлять биохимические превращения различных соединений. Максимальной численности ( $2,3 \cdot 10^6$  КОЕ/мл) достигают сапротрофные микроорганизмы, способные усваивать органические формы азота, и участвующие в трансформации загрязняющих веществ органического происхождения.

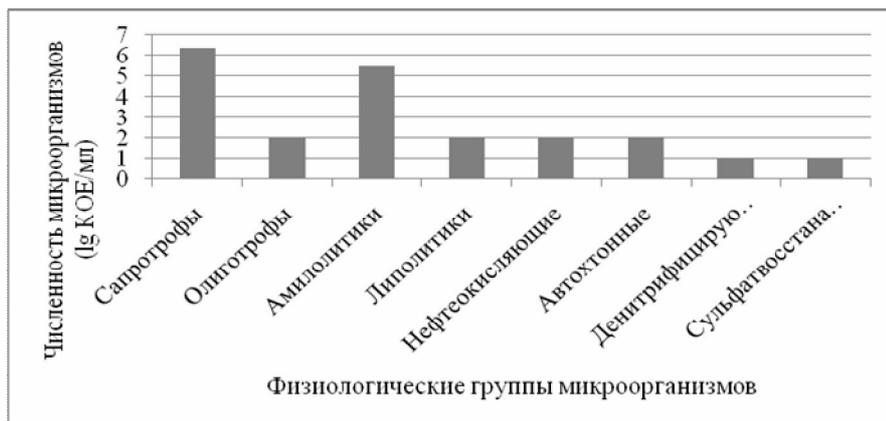
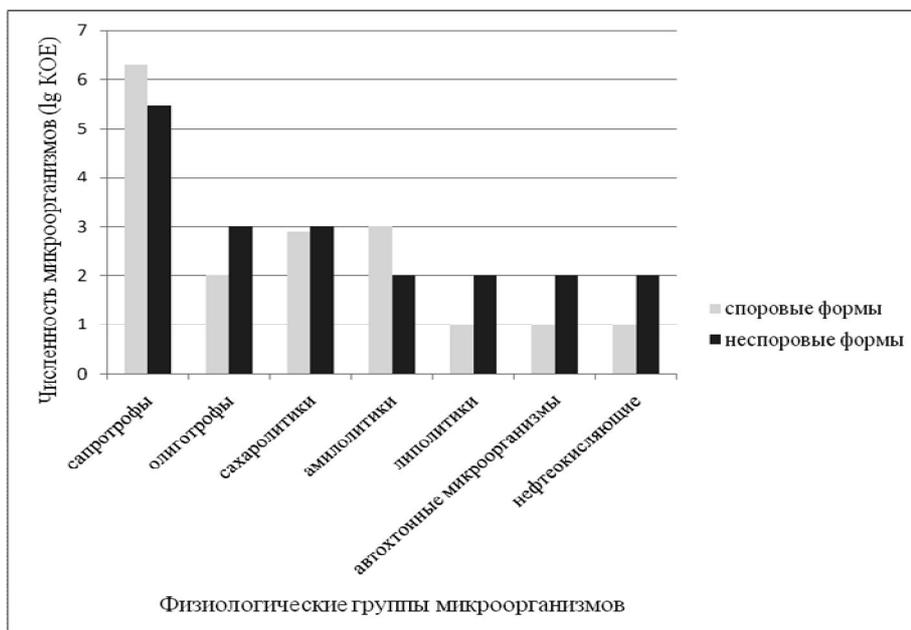


Рис. 1. Микробиологические показатели сточных вод резервуара-накопителя.

В соотношении споровых и неспоровых форм наблюдается приблизительное равенство, что говорит о наличии микроорганизмов, приспособившихся к неблагоприятным условиям среды (рис 2). Данные микроорганизмы представляют большой интерес для исследования в качестве объектов биотехнологии.



При постановке накопительных микробных культур на основе сточных вод установлено, что при экспозиции происходит подщелачивание сред. На данном этапе выделены чистые культуры алканотрофных гетеротрофных (бактерии, плесневые грибы, дрожжи) и фототрофных (цианобактерии) организмов. Предварительные лабораторные исследования показывают, что моделирование различных приемов использования комплекса аборигенных организмов способствует значительному обесцвечиванию сточных вод, что является значительным преимуществом для использования данных консорциумов в разработке приемов детоксикации и очистки сточных вод от мазута.

#### Литература:

1. Заварзин Г.А., Бонч-Осмоловская Е.А. (1981) Синтрофные взаимодействия в сообществе микроорганизмов. – Изв. АН СССР. Сер.биол., 2.
2. Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Агропромиздат, 1987. – 232с.

## Выделение и изучение *Desulfosporosinus* sp. DB - перспективного для биогеотехнологии осаждения металлов

Герасимчук А.Л.<sup>1</sup>, Буторова О.П.<sup>1</sup>, Тихонова З.Л.<sup>1</sup>, Стыкон Г.А.<sup>1</sup>, Яненко А.С.<sup>2</sup>, Карначук О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный университет, Кафедра физиологии растений и биотехнологии, 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, e-mail: [bio@green.tsu.ru](mailto:bio@green.tsu.ru)

<sup>2</sup>ФГУП ГНЦ ГосНИИгенетика, 117545, Россия, Москва, 1-ый Дорожный пр., д.1

Сульфатредуцирующие бактерии являются перспективными организмами для различных технологических процессов осаждения металлов. Металлы связываются в виде нерастворимых сульфидов под действием образуемого микроорганизмами сероводорода. Осаждение сульфидов может быть использовано как для очистки отходов, так и для регенерации и вторичного использования металлов в производстве. Одним из важных требований к микроорганизмам, используемым для биогеотехнологий, является устойчивость к высоким концентрациям ионов металлов. Также существенным фактором служит толерантность бактерий к низким рН среды, так как часто интенсивные окислительные процессы в отходах добычи и производства металлов приводят к созданию кислых условий. Целью данного исследования было выделение сульфатредуцирующих прокариот (СРП) устойчивых к кислым условиям среды и высоким концентрациям ионов тяжелых металлов.

Для выделения перспективных СРП использовали пробы осадков хвостохранилища добычи золота на месторождении «Новый Берикуль» в Кузбассе. Изученные осадки характеризовались крайне низким значением рН от 2.4 до 2.8. В обеих изученных пробах, обозначенных Хa115 и Хa116, методами масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES) обнаружена высокая концентрация ионов металлов. Содержание железа достигало 9100, цинка – 351, и меди – 35 мг/л.

Из проб осадков были получены накопительные культуры на среде Видделя (Widdel, Bak, 1992). В качестве источников энергии и доноров электронов использовали лактат, ацетат и этанол. Культивирование проводили как в нейтральных (рН=7.2), так и кислых (рН=2-3) условиях среды, а также при повышенной концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (до 200 мг/л). Молекулярный анализ полученных накопительных культур проводили методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Филогенетический анализ фило типов показал, что все обнаруженные в культурах организмы, для которых известна способность к сульфатредукции, относилось к роду спорообразующих *Desulfosporosinus* (Рис. 1). Представители Deltaproteobacteria, которые представляют самую многочисленную группу СРП, известных к настоящему времени, в наших пробах обнаружены не были.

Из накопительной культуры на этаноле (рН2,  $\text{Cu}^{2+}$  200 мг/л) путем пересевов на разведения с постепенным повышением концентрации меди до 650 мг/л выделена чистая культура спорообразующих СРП, обозначенная как штамм DB. Культура представлена подвижными слегка изогнутыми палочками размером 2-5 x 0.7-1.5 мкм (Рис. 2). Филогенетическое положение штамма DB установили путем определения последовательности нуклеотидов близкой к полной гена 16S рРНК. Филогенетический анализ последовательности длиной 1473 п.о. поместил штамм в филум Firmicutes, род *Desulfosporosinus*. Штамм филогенетически удален от известных культивируемых и некультивируемых представителей этого рода.

Ближайшим родственником является *Desulfosporosinus auripigmenti*, гомология последовательностей гена 16S рРНК с которым составляет 96.6% (Рис. 1).

Исследования возможности использования органических субстратов показали, что штамм хорошо растет на лактате, этаноле, малате, ацетате, fumarate, пирувате и глицерине. Менее активный рост наблюдается на глюкозе, сахарозе, изобутаноле и фруктозе. Слабый рост зафиксирован при внесении цитрата и никотиновой кислоты. Бактерия не росла на пропионате и пропаноле. *Desulfosporosinus* sp. DB характеризовался ацидофильным характером роста. Рост в среде с нейтральным pH отсутствовал. Оптимальная кислотность среды для роста штамма DB 4.0-5.0.

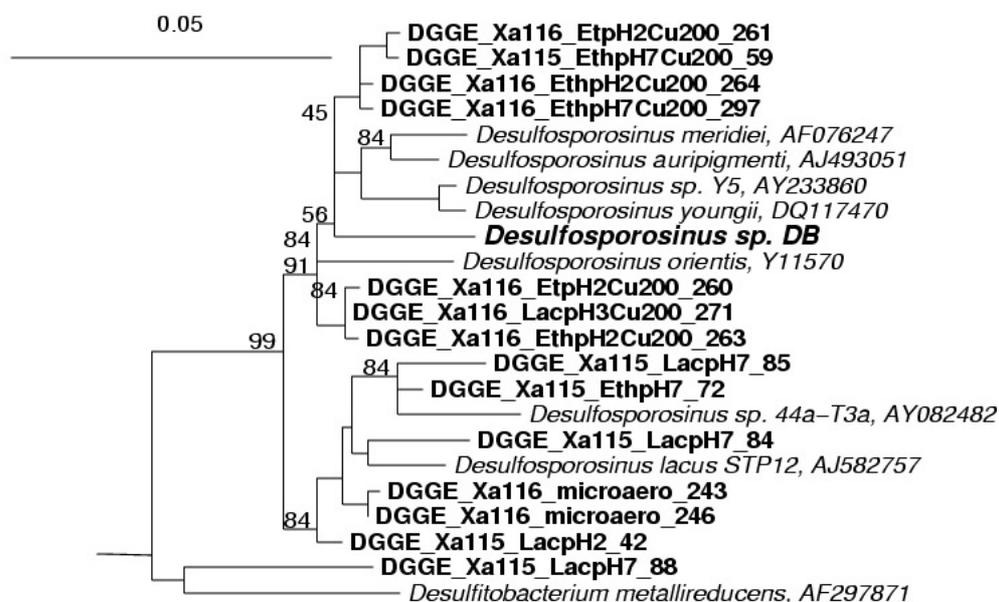


Рис. 1 – Филогенетическое положение филоципов, разделенных методом DGGE, из накопительных культур Xa115 и Xa116 и *Desulfosporosinus* sp. DB. Более короткие последовательности добавлены с использованием parsimony analysis к дереву, построенному ранее методом ближайшего соседа (neighbor-joining). *Pelotomaculum isophthalicum* AB232785 (не показан на дереве) был выбран в качестве удаленной группы.

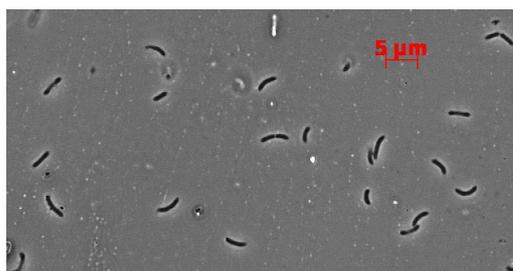


Рисунок 2 – Микрофотография штамма DB

Хотя сообщения об активности сульфатредуцирующих бактерий в кислых условиях среды встречаются в литературе, однако до сих пор ацидофильные СРП описаны не были. Отличительной особенностью штамма DB является устойчивость к  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрации до 5 г/л.

Способность данного штамма к росту при таком высоком содержании меди в среде и низкой кислотности среды делает его

перспективным для возможного использования в биоготехнологиях осаждения металлов.

Исследование было частично поддержано грантами РФФИ 07-04-01554-а и Федерального Агентства Образования РФ РНП.2.1.1.7338, а также госконтрактом Министерства Науки РФ по программе ФЦ НТП №02.512.2003. Финансирование исследований А.Л. Герасимчук осуществлялось в рамках проекта РФФИ 07-04-90833-моб\_ст.

## Роль микробных аутоиндукторов анабиоза в регуляции экспрессии стрессовых регулонов

Голод Н.А.<sup>1</sup>, Лойко Н.Г.<sup>2</sup>, Эль-Регистан Г.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, 125047, Москва, Миусская пл. 9, e-mail: [Natalya\\_82@mail.ru](mailto:Natalya_82@mail.ru)

<sup>2</sup> Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН, 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, к.2

При стрессовых воздействиях в популяциях микроорганизмов возникают адаптивные мутации, способствующие увеличению внутривидового генетического разнообразия – развитию фенотипов, способных приспособиться и выжить в новых условиях. Молекулярные механизмы популяционной вариабельности изучены недостаточно. У ряда бактерий была обнаружена зависимость между увеличением доли минорных фенотипов и изменением уровня внеклеточных аутоиндукторов анабиоза, относящихся к алкилоксибензолам (АОБ) [1]. В дальнейшем было показано, что АОБ способны изменять топологию ДНК [2] и индуцировать генетические перестройки, вследствие проявления мутагенной активности [3]. Так как увеличение частоты внутригеномных перестроек у бактерий проявляется при реализации стрессовых ответов, то целью данного исследования стало выявление способности аутоиндукторов анабиоза индуцировать экспрессию генов стрессовых регулонов клетки: SOS-ответа и общего *rpoS*-зависимого регулона стационарной фазы. Для этого были сконструированы транскрипционный и трансляционный фьюзы модельного гена *umuD* с реперным геном *lacZ* (продукт гена *umuD* - комплекс  $umuD_2C$  или  $\rho IV$  - у *E.coli* участвует в формировании SOS-ответа клетки, и его экспрессия кодируется RecA белком). Аналогичным образом были получены конструкции с участием в качестве модельного гена *osmE* (ген *osmE* кодирует стресс-индуцибельные липопротеины наружной мембраны, и его экспрессия находится под контролем белка RpoS или  $\sigma^{38}$ ). Уровень экспрессии гибридных оперонов *osmE::lacZ* и *umuD::lacZ* оценивали по активности образовавшегося в клетках фермента  $\beta$ -галактозидазы. В экспериментах использовали химические аналоги ауторегуляторов анабиоза, отличающиеся длиной алкильного радикала и гидрофобностью – C<sub>12</sub>-АОБ и C<sub>7</sub>-АОБ, которые вносили в клеточные суспензии сконструированных штаммов *E.coli* c600 thi, thr, leu  $\Delta$  pro-lac/pJEL250[246]Amp<sup>R</sup>::*umuD::lacZ* и *E.coli* c600 thi, thr, leu  $\Delta$  pro-lac/pJEL250[246]Amp<sup>R</sup>::*osmE::lacZ* различных фаз роста, и после часа экспозиции оценивали уровень экспрессии исследуемых генов. АОБ применяли в концентрациях не вызывающих ингибирования роста бактерий (C<sub>12</sub>-АОБ до 100 мкг/мл; C<sub>7</sub>-АОБ до 600 мкг/мл).

Было показано, что оба ауторегулятора во всех испытанных концентрациях контролируют экспрессию модельных генов на уровне транскрипции, но не трансляции. Воздействие C<sub>12</sub>-АОБ на экспоненциальные клетки *E. coli* приводило к дозозависимому увеличению уровня экспрессии гена *umuD* в 1,7 и 1,9 раза при концентрации от 50 до 100 мкг/мл. C<sub>12</sub>-АОБ в концентрации 35 и 70 мкг/мл увеличивал уровень экспрессии гена *osmE* в клетках стационарной фазы *E.coli* в 1,5 и 2,2 раза, соответственно, и что особенно важно, индуцировал экспрессию *rpoS*-зависимого гена в клетках экспоненциальной фазы роста, при этом превышение над спонтанным фоном было более чем в 1,5 раза (рис.1 а,б).

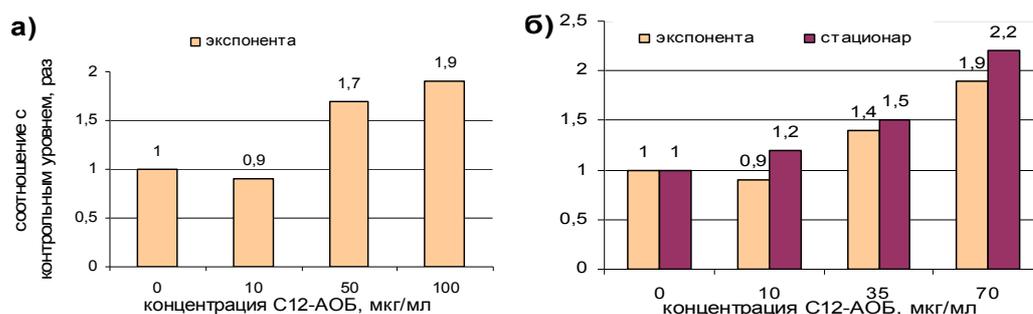


Рис. 1. Влияние C<sub>12</sub>-АОБ на экспрессию генов: (а) *umuD* и (б) *osmE*.

Другой химический аналог – C<sub>7</sub>-АОБ, *in vivo* индуцировал (в 1,4 и 1,7 раза) экспрессию *osmE-lacZ* при значительно более высоких концентрациях: 200 – 600 мкг/мл и только в клетках стационарной фазы (рис.2а). Учитывая антимуtagenную активность C<sub>7</sub>-АОБ [3], были проверены его протекторные свойства в тесте индукции SOS-ответа клеток при воздействии УФ. Внесение C<sub>7</sub>-АОБ в суспензии клеток *E. coli* в концентрациях 10-100 мкг/мл за 30 минут до воздействия УФ-облучения заметно снижало уровень экспрессии гена *umuD* (рис. 2б). Это подтверждает протекторную функцию C<sub>7</sub>-АОБ в стрессовых ситуациях, когда при повышении его концентрации в клетках повреждений генома от воздействия УФ-облучения становится меньше, чем в контроле.

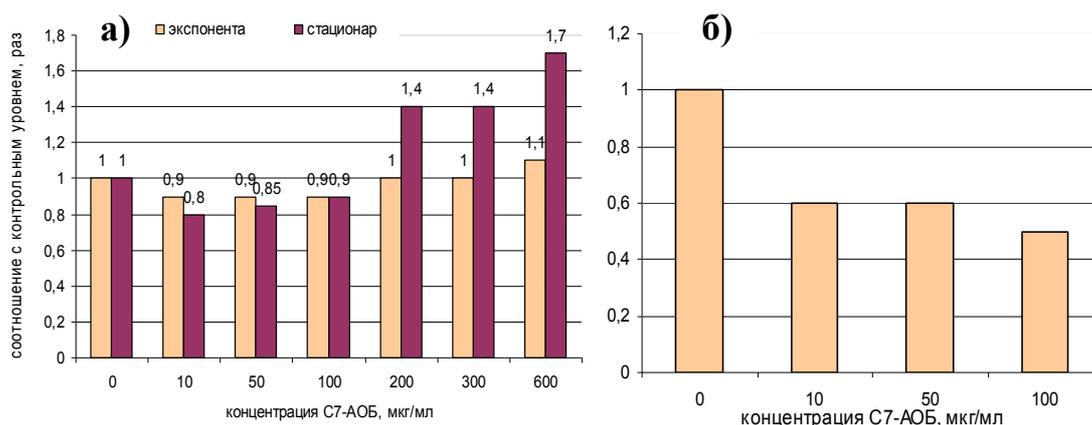


Рис. 2. Влияние C<sub>7</sub>-АОБ на экспрессию генов: (а) *osmE*; (б) *umuD*.

Таким образом, впервые достоверно показано, что аутоиндукторы анабиоза принимают участие в регуляции экспрессии стрессовых регулонов, что в сочетании с другими функциями этих ауторегуляторов позволяет отнести их к полифункциональным микробным адаптогенам. Дальнейшая работа направлена на изучение молекулярных механизмов действия аутоиндукторов анабиоза в формировании адаптационных реакций микроорганизмов, в частности диссоциативных переходов фенотипов.

#### Список литературы:

1. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. (2006) – Микробиология, 75, 4, 446-456.
2. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никитин А.Н., Эль-Регистан Г.И. (2005) – Микробиология, 74, 5, 616-625.
3. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленихин П.В., Круглова З.Ф., Чойдаш Б., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. (2002) – Микробиология, 71, 2, 194 – 199.

## Встречаемость генов факторов патогенности среди штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных у ВИЧ-инфицированных

Гончаров А.Е.

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Санкт-Петербургская Государственная Медицинская Академия им. И.И. Мечникова Министерства здравоохранения Российской Федерации"  
195067, г. Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47, e-mail: [phage1@yandex.ru](mailto:phage1@yandex.ru)

В настоящее время, заболевания бактериальной этиологии, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией, представляют серьезную медико-социальную проблему. В связи с этим представляются весьма востребованными исследования, направленные на изучение микроэволюционных процессов в популяциях возбудителей, поражающих иммунодефицитную прослойку населения. Среди ВИЧ-инфицированных имеются условия для последовательного пассирования вирулентных микроорганизмов через особи с большим иммунодефицитом, к особям с меньшим иммунодефицитом, что может привести к формированию гипервирулентных штаммов возбудителя и/или штаммов с большим эпидемическим потенциалом.

Известно, что больные ВИЧ-инфекцией, находящиеся в стадии СПИДа являются группой риска в отношении колонизации таким важным патогеном-возбудителем гнойно-септических инфекций как золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*). Особую озабоченность вызывает возможность эпидемического распространения метициллин-резистентных штаммов этого возбудителя, в т.ч. и в обычной (ВИЧ-негативной) популяции.

Ранее было показано, что штаммы, выделяемые от пациентов со СПИД характеризуются невысоким генетическим разнообразием, что, в частности, позволило Gordon RJ с соавт. отнести на основании типирования методами пульс-электрофореза и sra- генотипирования 244 изученных штамма всего лишь к двум клональным типам. [2]. Вместе с тем, нам не известны какие-либо исследования, направленные на изучение частоты встречаемости вирулентных штаммов золотистого стафилококка, колонизирующих ВИЧ-инфицированных пациентов. Данное обстоятельство обусловило необходимость проведения настоящего исследования.

### Материалы и методы

В течение апреля-июня 2008 года было проведено бактериологическое обследование на носительство в носоглотке *S. aureus* 49 ВИЧ-позитивных пациентов, госпитализированных в СПб ГУЗ Центр инфекционных заболеваний с клиническими проявлениями СПИД. Первичное выделение культур стафилококков проводили на маннитол-солевом агаре (HIMEDIA, Индия) с последующей видовой идентификацией общепринятыми микробиологическими методами. В результате обследования у 22 пациентов было выделено 25 культур золотистого стафилококка, которые были использованы в настоящей работе. Нами также было использовано 5 контрольных штаммов *S. aureus*, выделенных ранее от здоровых носителей. Все выделенные штаммы подвергались генетическому типированию методом ПЦР по наличию/отсутствию генов следующих факторов патогенности: энтеротоксины А, В, С, М (*sea*, *seb*, *sec*, *sem*), эксфолиативные токсины А и В (*eta*, *etb*), белок токсического шока (*tst*), гемолизина  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\delta$ . ПЦР проводили по методике Mehrotra M [3] и Jarraud S [1]

## Результаты и обсуждение

Количество штаммов, несущих гены факторов патогенности среди изолятов, выделенных у ВИЧ-инфицированных и у здоровых носителей представлены в таблице 1.

Таблица 1. Обнаружение генов факторов патогенности в культурах стафилококков, выделенных у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных лиц

факторы патогенности	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sem</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>tst</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>hld</i>
ВИЧ+, n=25	2 (8%)	0	1 (4%)	3 (12%)	0	0	0	4 (16%)	0	8 (32%)
контрольная выборка, n=5	0	0	0	0	0	0	0	2 (40%)	0	0

Из таблицы видно, что ряд факторов вирулентности, в частности энтеротоксины А, С, М, гемолизин  $\delta$  были идентифицированы только в группе изолятов, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов. Несмотря на незначительный объем изученных выборок данное обстоятельство позволяет поставить вопрос о носителях золотистого стафилококка из числа ВИЧ-инфицированных как о возможном резервуаре вирулентных штаммов этого возбудителя, что требует проведения дополнительных углубленных исследований. Необходимо отметить, что некоторые обнаруженные гены факторов патогенности (*sea*, *hla*) имеют фаговую локализацию и возможность к распространению путем горизонтального генетического обмена, что может быть значимым при формировании высоковирулентных эпидемических вариантов *S.aureus*.

Дальнейшие исследования, по-видимому, должны быть направлены на проведение сравнительного молекулярно-генетического анализа и клоальности штаммов стафилококка, выделенных в группах пациентов с различной степенью снижения иммунитета.

## Литература:

1. Jarraud S., Mougél C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F. (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. – *Infect Immun.*, 70(2), 631-41.
2. Gordon R.J., Quagliariello B., Cespedes C., Chung M., de Lencastre H., Vavagiakis P., Miller M., Zeller B., Lowy F.D. (2005) A molecular epidemiological analysis of 2 *Staphylococcus aureus* clonal types colonizing and infecting patients with AIDS. – *Clin Infect Dis.*, 1, 40(7), 1028-36.
3. Mehrotra M., Wang G., and Johnson W.M. (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. – *J.Clin. Microbiol.*, 38, 3, 1032-1035.

## Характеристика белков S-слоя *Bacillus anthracis* – перспективных компонентов химических сибирезвенных вакцин

Гончарова А.Ю., Микшис Н.И., Попов Ю.А.

ФГУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”, Саратов, 410005, Университетская, 46; e-mail: [microbe@san.ru](mailto:microbe@san.ru)

*Bacillus anthracis* - возбудитель сибирской язвы, тяжелого инфекционного заболевания животных и людей и один из вероятных агентов биотеррористических актов. Для профилактики возникновения и распространения инфекции при угрозах заражения, в эндемичных областях и группах риска используют живые и химические вакцины. Основными недостатками живых вакцин является довольно высокая реактогенность, приводящая к развитию побочных реакций, а химических - слабая напряженность и непродолжительность иммунитета, обусловленная, вероятно, тем, что они содержат один иммуноген – протективный антиген (ПА) возбудителя сибирской язвы. Включение в состав профилактических препаратов новых компонентов, усиливающих их защитные свойства, является одним из перспективных направлений разработки современных вакцин. Потенциальными кандидатами на роль дополнительных иммуногенных составляющих химических сибирезвенных вакцин по данным биоинформационного анализа [1,2,3] могут быть белки поверхностного S-слоя *B.anthraxis* - Sap и EA1, кодируемые хромосомными генами [4].

На основании вышеизложенного, целью работы являлась характеристика биологических и иммунологических свойств белков S-слоя *B. anthracis*.

Первоначально была проведена селекция штаммов сибирезвенного микроба по уровню секреции белков S-слоя. Оценку эффективности продукции белков Sap и EA1 проводили путем электрофоретического анализа культуральных фильтратов набора производных аттенуированных штаммов и природных изолятов *B. anthracis*. В качестве доноров белков S-слоя отобрали дериваты вакцинных штаммов *B. anthracis* Sterne 34F2, *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 2<sup>ая</sup> вакцина Ценковского. Поскольку штаммы возбудителя сибирской язвы содержат в своем составе две плазмиды - рХО1, кодирующую синтез протективного антигена, отечного и летального факторов, и рХО2, детерминирующую синтез полиглутаминовой капсулы - для облегчения процедуры выделения протеинов S-слоя были получены бесплазмидные производные отобранных штаммов. Далее, учитывая данные о деградации белков S-слоя под влиянием внутриклеточных протеолитических ферментов, селектированы стабильные протеазонегативные производные *B. anthracis* SterneΔT и 2<sup>ой</sup> вакцины Ценковского pf. Из полученных штаммов-продуцентов осуществлено выделение белков Sap и EA1 и их ступенчатая хроматографическая очистка. Выделенные протеины идентифицированы как компоненты S-слоя *B. anthracis* на основании значений молекулярных масс, паракристаллической ультраструктуры, выявленной с помощью электронной микроскопии, особенностей аминокислотного состава, иммунореактивности и локализации на поверхности клетки.

Изучение протективности очищенных препаратов Sap и EA1 проводили на модели морских свинок. Лабораторных животных иммунизировали очищенными препаратами Sap, EA1 и для сравнения - вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ1. В

результате, значения ЛД<sub>50</sub> тест-заражающей культуры для морских свинок, иммунизированных белками Sap и EA1, оказались, соответственно, в 36,9 и 3,3 больше, чем тот же показатель для интактных животных. Иммуногенность вакцинного штамма, продуцирующего ПА, предсказуемо почти на три порядка превышала иммуногенность белковых препаратов.

Помимо определения иммуногенных свойств отдельных белков S-слоя изучали протективную активность комбинированного препарата ПА+EA1. Лабораторных животных (кроликов) иммунизировали очищенными антигенами ПА и EA1, в сочетании с полным адьювантом Фрейнда. Через 21 день после последней инъекции животных заражали 50 ЛД<sub>50</sub> высоковирулентного штамма *B. anthracis* 81/1. Все интактные особи пали от сибиреязвенной инфекции на третьи сутки. Все кролики, иммунизированные ПА + EA1, а также споровой взвесью вакцинного штамма выжили.

Изучение влияния белков S-слоя на развитие адаптивного иммунитета *in vivo* осуществляли с использованием изогенной системы Sap<sup>+</sup> и Sap<sup>-</sup> вариантов *B. anthracis* SterneΔT. Для изучения влияния Sap<sup>-</sup> мутации на протективные свойства микроорганизма репликон pXO1 из донорного штамма *B. anthracis* передали посредством конъюгации в изогенные антибиотикорезистентные реципиенты на основе исходного штамма *B. anthracis* SterneΔT и его спонтанного Sap<sup>-</sup> мутанта - *B. anthracis* SterneΔTSap<sup>+</sup>Sm<sup>f</sup> и *B. anthracis* SterneΔTSap<sup>-</sup>Sm<sup>f</sup>. Морских свинок иммунизировали споровыми взвесями Sap<sup>+</sup> и Sap<sup>-</sup> трансконъюгантов, заражение проводили культурой *B. anthracis* 2<sup>ая</sup> вакцина Ценковского в возрастающих дозах. В результате иммуногенность Sap<sup>-</sup> мутанта оказалась в три раза ниже по сравнению с Sap<sup>+</sup> исходным вариантом. То есть, *in vivo* белок S-слоя способен усиливать протективную активность продуцирующего ПА штамма сибиреязвенного микроба.

Таким образом, в совокупности результаты, полученные при изучении защитных свойств белковых препаратов Sap, EA1 и ПА+EA1, а также изогенных Sap<sup>+</sup> и Sap<sup>-</sup> штаммов *B. anthracis*, дают основания расценивать компоненты S-слоя возбудителя сибирской язвы как дополнительные факторы иммуногенности.

Селекционированные нами бесплазмидные (атоксигенные и бескапсульные) протеазодефицитные производные штаммов сибиреязвенного микроба могут быть рекомендованы для биотехнологических процедур получения иммуногенных белков S-слоя *B. anthracis* с целью последующего их использования при конструировании сибиреязвенных химических вакцин нового поколения.

#### Литература:

1. Ariel N., Zvi A., Makarova K.S. et al. (2003) – Infect. Immun., 71, 8, 4563 – 4579.
2. Chitlaru T., Ariel N., Zvi A. et al. (2004) – Proteomics., 4(3), 677 – 691.
3. Gat O., Grosfeld H., Ariel N. (2006) – Infect. Immun., 74, 7, 3987 – 4001.
4. Mesnage S., Tosi-Couture E., Mock M. et al. (1997) – Mol. Microbiol., 23, 6, 1147 – 1155.

## Регуляция экспрессии генов межклеточной коммуникации бактерий метаболитами растений

Горшков В.Ю., Петрова О.Е., Мухаметшина Н.Е., Гоголев Ю.В.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань,  
e-mail: [gy84@mail.ru](mailto:gy84@mail.ru)

Становление взаимоотношений между бактериями и растениями является сложным многостадийным процессом, в котором одна из ключевых ролей отводится взаимному обмену информационными сигналами между макро- и микроорганизмом. Известно, что полноценная продукция бактериальных ферментов, модифицирующих структуру клеточной стенки растения-хозяина, реализуется только в присутствии факторов растительного происхождения.

Помимо такого внешнего контроля, существует также внутренний контроль координированной экспрессии генов для реализации оптимальной физиологической программы при растительно-микробных взаимодействиях, который называется «чувством кворума». При этом бактериальные клетки регулируют уровень экспрессии определенных групп генов посредством низкомолекулярных соединений – аутоиндукторов, которые накапливаются в окружающей среде при высокой плотности популяции. В дальнейшем такие сигнальные факторы распознаются сенсорными мембранными белками и активируют сигнальный каскад, контролирующей экспрессию ряда генов. Под таким контролем, в частности, находятся факторы вирулентности фитопатогенных бактерий, что препятствует их преждевременной продукции и образованию элиситорных молекул, активирующих защитные реакции растения-хозяина.

Классическая схема регуляции по принципу чувства кворума включает фермент, ответственный за синтез сигнальных соединений, а также его репрессор, действие которого снимается при связывании с аутоиндуктором, что приводит к его лавинообразному накоплению в среде. У микроорганизма *Erwinia carotovora*, продуцирующей ацилгомосерин лактоны (АГЛ) в качестве сигнальных факторов межклеточной коммуникации, по-видимому, помимо классической схемы активации АГЛ-синтазы, имеется также регуляторная ветка, ответственная за активацию соответствующего гена в присутствии растения-хозяина. Эта сигнальная цепь может реализовываться за счет сенсоров факторов растительного происхождения – KdgR и RsmC.

Для проверки этого предположения мы разработали тестовую систему на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием флуоресцентных зондов TaqMan. На среде, имитирующей условия апопласта и индуцирующей факторы вирулентности, уровень экспрессии гена АГЛ-синтазы (*expI*) был значительно выше при добавлении тканей картофеля – специфического растения-хозяина. В свою очередь, ткани неспецифического растения-хозяина – табака – не оказывали индуцирующего эффекта на транскрипцию данного гена. Известно, что факторы межклеточной коммуникации осуществляют позитивный контроль над ключевыми факторами вирулентности и, в частности, над

экзоферментами, разрушающими клеточную стенку растения. В связи с этим нами была исследована динамика экспрессии гена пектатлиазы *C* (*pelC*). Высокий уровень транскрипции данного гена наблюдали только в присутствии тканей специфического растения-хозяина. Эти данные были также подтверждены высоким уровнем пектатлиазной активности в культуральной жидкости. В культурах *E. carotovora*, с добавлением тканей неспецифического хозяина – табака – активность пектатлиазы не наблюдали.

Таким образом, нами показано, что при взаимодействии со специфическим хозяином происходит активация генов межклеточной коммуникации, что приводит к сверхпродукции факторов вирулентности, необходимых для успешного развития патологического процесса. Вероятно, что такая специфичная активация происходит за счет соединений растительного происхождения, которые не являются конститутивными и присутствуют только в тканях специфического растения.

## Сверхэкспрессия генов холерного токсина, связанная с изменением генома профага СТХФ *Vibrio cholerae*

Горяев А.А.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,  
Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [microbe@san.ru](mailto:microbe@san.ru)

К настоящему времени совершенно очевидна существенная роль мобильных генетических элементов (МГЭ) в эволюции прокариот. Вместе с тем, проблема variability патогенных свойств у возбудителей различных болезней человека за счет измененной активности генов вирулентности, индуцируемой включившимися в их геномы МГЭ, нуждается в дальнейших исследованиях. Выбранный в качестве модельного объекта возбудитель холеры *Vibrio cholerae* содержит в двух хромосомах различные МГЭ, включая и нитчатый профаг СТХФ, несущий *ctxAB* – гены холерного токсина (ХТ), который является ключевым фактором патогенности. Известно, что variability генома этого профага может привести к возникновению нетоксигенных клонов, однако сведения о сверхэкспрессии генов *ctxAB* в результате изменения его структуры практически отсутствуют. Данная работа посвящена получению, а также молекулярно-генетическому и протеомному анализу транспозонных мутантов *V. cholerae* МАК757 с измененной продукцией ХТ, кодируемого профагом СТХФ.

Профаг СТХФ внедрен в специфический сайт одной из хромосом *V. cholerae* и состоит из коровой области и участка ДНК, обозначенного как RS2. Коровая область, кроме оперона *ctxAB*, содержит гены *zot*, *ace*, *sep*, *orfU*, *psh*, определяющие биосинтез белков, необходимых для формирования фаговых частиц. В RS2 локализованы гены *rstA*, *rstB* и *rstR*, контролирующие репликацию, интеграцию и регуляцию указанного фага. У взятого штамма МАК757 на большой хромосоме имеются две копии профага СТХФ, расположенные в tandemном порядке, которые определяют продукцию 0,02 мкг/мл ХТ II типа.

В качестве чужеродного МГЭ был выбран транспозон Tn5-Mob ( $Km^R$ ), поскольку ранее нами было показано, что предпочтительный сайт его внедрения локализован в хромосоме в непосредственной близости от СТХФ. Для получения инсерционных мутантов на первом этапе транспозон был введен в клетку в составе векторной конъюгативной плазмиды pSUP5011. Исключение Tn-элемента из плазмидной ДНК и внедрение его в бактериальную хромосому производили путем излечения клеток от плазмиды, одновременно создавая условия для селекции клонов, сохранивших Tn5-Mob ( $Km^R$ ). У полученных  $Km^R$ -клонов с помощью ПЦР и ДНК-ДНК гибридизации изучали структуру профага и определяли продукцию ХТ. В результате оказалось, что внедрение Tn5-Mob в хромосому МАК757 почти в 5% случаев вызывает образование мутантов трех типов. У мутантов первого типа (обозначенных как  $Km^R Tox^{++}$ ) происходит утрата одной из копий профага и делеция генов *zot*, *ace*, *sep*, *orfU* второй его копии (см. табл.). Уровень биосинтеза ХТ у таких клонов, потерявших более 60% генома коровой части оставшегося профага, но сохранивших лишь оперон *ctxAB*, возрастает более чем в 2000 раз по сравнению с исходным штаммом, составляя 42,0-45,0 мкг/мл по данным ELISA. Во второй группе мутантов ( $Km^R Tox^+$ ) встраивание транспозона в хромосому не сопровождалось реорганизацией профага, однако уровень биосинтеза ХТ возрос более в 100 раз (2,7 мкг/мл). И в последнюю группу входили нетоксигенные мутанты ( $Km^R Tox^-$ ), возникшие в результате утраты всех генов двух профагов за исключением гена *rstR*.

Таблица. Результаты ПЦР-анализа исходного штамма *V.cholerae* МАК757 и его инсерционных мутантов, содержащих транспозон Tn5-Mob в бактериальном геноме

Штамм	Tn5-Mob	Тестируемые гены профага СТХφ								
		<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>	<i>zot</i>	<i>ace</i>	<i>orfU</i>	<i>cep</i>	<i>rstA</i>	<i>rstB</i>	<i>rstR</i>
МАК757 (исходный)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
МАК757 chr::Tn5-Mob Km <sup>R</sup> Tox <sup>++</sup>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
МАК757 chr::Tn5-Mob Km <sup>R</sup> Tox <sup>+</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
МАК757 chr::Tn5-Mob Km <sup>R</sup> Tox <sup>-</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Таким образом, впервые получена информация о структурных и функциональных изменениях генома профага СТХφ, обусловленных внедрившимся транспозоном. Особый интерес представляет новые данные о сверхэкспрессии генов *ctxAB* при существенной редукции генома профага, которая, возможно, связана с функциональным изменением репрессорных функций. Эти результаты очень важны для понимания путей формирования в современный период природных штаммов *V.cholerae* с повышенной вирулентностью.

Далее, встал вопрос о том, влияют ли изменения структуры профага на экспрессию других хромосомных генов? В этой связи был проведен сравнительный протеомный анализ белков, синтезируемых изогенными штаммами – исходным штаммом МАК757 и его инсерционным мутантом с гиперпродукцией ХТ (Km<sup>R</sup> Tox<sup>++</sup>), обозначенным как КМ234. При компьютерном анализе протеомных карт, полученных в Центре постгеномных технологии при НИИ БМХ им. Б.Н.Ореховича, было выявлено, что редукция генома профага действительно сопровождается изменением экспрессии 27 белков, из которых идентифицировано 14. Установлено, что в клетках КМ234 репрессируются синтез 23 белков с разными функциями и индуцируется синтез только 4-х белков. В частности, у мутанта увеличена экспрессия белков, связанных с АВС транспортной системой, играющей важную роль в поступлении в клетку питательных веществ. В целом, полученные данные указывают на существенное изменение клеточного метаболизма и энергетического гомеостаза у штамма КМ234, что связано, видимо, с гиперэкспрессии генов ХТ.

Таким образом, в результате выполнения данной работы впервые показана возможность возникновения штамма со сверхэкспрессии генов ХТ за счет инсерционных изменений генома профага СТХφ. Полученные данные имеют не только фундаментальное значение, углубляя наши представления о путях формирования патогенных штаммов с ранее неизвестными свойствами, но и прикладное. Впервые полученный штамм со сверхэкспрессией генов ХТ II типа используется для получения этого иммуногенного белка, который входит в состав холерных химических вакцин. Приоритетность этой работы подтверждена получением патента на изобретение «Штамм бактерий *Vibrio cholerae* КМ 234 биовара эльтор – продуцент холерного токсина II типа».

Работа поддержана грантом РФФИ (грант № 06-04-48310а)

## Характеристика области репликации плазмиды рАН36-4СРА штамма *Citrobacter hydrophyla* IBRB-36 4СРА

Жарикова Н.В.<sup>1</sup>, Маркушева Т.В.<sup>1</sup>, Кузнецов Б.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии УНЦ РАН, 450054, Уфа, п.Октября, 69, e-mail: [tvmark@anrb.ru](mailto:tvmark@anrb.ru)

<sup>2</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, e-mail: [moldiag@biengi.ac.ru](mailto:moldiag@biengi.ac.ru)

Известно, что способность к автономной репликации является важнейшим биологическим свойством любой бактериальной плазмиды, определяющим ее независимое (в определенных пределах) существование. Автономная репликация обеспечивается наличием области начала репликации, на которой происходит сборка макромолекулярного комплекса, осуществляющего инициацию и синтез плазмидной ДНК.

В настоящее время известно несколько типов репликационных регионов бактериальных плазмид, нашедших применение в биотехнологии.

Целью настоящей работы являлось исследование структурно-функциональной организации области репликации плазмиды рАН 36-4СРА.

Плазмида рАН36-4СРА была получена из клеток штамма *Citrobacter hydrophyla* IBRB-36 4СРА, выделенного из образцов смешанных популяций почвенных микроорганизмов промзоны г. Уфы. Предварительные исследования показали, что на плазмиде рАН36-4СРА локализованы детерминанты деградации хлорфеноксисукусных кислот.

Для анализа плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса. PDRF-анализ препаратов ДНК выполняли электрофорезом в 1% агарозном геле, с последующей документацией результатов в системе BioDoc Analyze («Biometra», Германия). Клонирование *Kzo9I* -, *RsaI* - и *AluI* - рестриционных фрагментов плазмиды рАН36-4СРА в *BamHI* и *HindIII* сайты полилинкера вектора рGEM-3Zf(+) («Promega», США) проводилось согласно рекомендациям производителя. Для получения рекомбинантов использовали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5 $\alpha$ .

Автоматическое секвенирование последовательностей клонированных фрагментов плазмиды рАН36-4СРА выполняли с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США), на приборе DNA Analyzes 3730, («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям производителя. Редактирование секвенированных нуклеотидных последовательностей осуществлялось с помощью пакета программ BioEdit. Скрининг сходства секвенированных последовательностей по базе данных GenBank проводили в программе BLASTA.

На первом этапе работы с целью определения нуклеотидной последовательности плазмиды рАН36-4СРА была создана библиотека перекрывающихся *RsaI*, *AluI* и *Kzo9I*- рестриционных фрагментов плазмиды. Секвенирование клонов в ходе работы сочеталось с секвенированием рАН36-4СРА с оригинальных праймеров для прочтения недостающих участков нуклеотидной последовательности плазмиды.

Сравнение нуклеотидной последовательности плазмиды рАН 36-4СРА с последовательностями, представленными в базе данных GenBank позволило идентифицировать один из регионов плазмиды рАН 36-4СРА (с 142 по 875 п.н.) как

область гомологичную областям репликации плазмид p26807 штамма *Yersinia enterocolitica* (AJ132618) на 91%, p15A (V00309) на 84% и ColE1 (J01566) на 71%, *E. coli*. С учетом того, что все три упомянутые плазмиды относятся к ColE1-типу, плазида рАН 36-4СРА была отнесена к этой же группе.

Обнаруженная гомология нуклеотидных последовательностей рАН36-4СРА и плазмид ColE1-типа позволила идентифицировать элементы, участвующие в репликации исследуемой плазмиды. Известно, что репликация ColE1 начинается с синтеза предшественника праймера РНК II. При этом 3' концы РНК II транскриптов формируют постоянный гибрид с ДНК-матрицей вблизи *ori*. Фермент РНКазы H узнает и разрезает гибриды ДНК-РНК II в точке начала репликации в пределах пяти последовательностей ААААА и генерирует образование зрелых молекул праймера. Такие транскрипты являются мишенью для ДНК-полимеразы I, которая добавляет дезоксирибонуклеотиды к их 3'-ОН концам.

Установлено, что плазида рАН36-4СРА обладает репликационной системой, в состав которой входит праймер РНК II размером 522 п.н. (позиции с 204 по 725 п.н.). Однако в структуре промоторных регионов -35 и -10 для РНК II плазмиды рАН36-4СРА наблюдались некоторые отличия от гомологичных последовательностей p26807, p15A и pColE1. У рАН36-4СРА в промоторной области -35 обнаружена замена одного нуклеотида в позиции 156 и вставка другого в позиции 156. В промоторе РНК II - 10 заменены два нуклеотида -это позиции 181, 182.

Ранее было показано, что регуляция инициации у плазмид ColE1-типа осуществляется во время синтеза РНК II через комплементарный 108-нуклеотидный антисмысловый транскрипт - РНК I.

Размер комплементарной праймеру регуляторной последовательности - РНК I плазмиды рАН 36-4СРА составил 103 п.н. (позиции с 207 по 310 п.н.). Промоторные регионы -35 (позиции 346-341) и -10 (позиции 317-322) плазмиды рАН 36-4СРА оказались полностью идентичными промоторам РНК I плазмид p26807, p15A и pColE1.

Выявлено, что точка начала репликации *oriV* плазмиды рАН 36-4СРА локализована в позиции 726 п.н., а прилегающая к ней область оказалась идентичной последовательностям *oriV* p26807, p15A и pColE1. Установлено, что регуляторный белок - ROM рАН 36-4СРА не кодируется.

Таким образом, в результате работы была определена нуклеотидная последовательность репликационного региона плазмиды рАН 36-4СРА, что позволило достоверно отнести ее к ColE1-типу. Установлено, что репликационная система рАН 36-4СРА состоит из праймера РНК II, регуляторной комплементарной последовательности – РНК I, точки начала репликации – *oriV*. Выявлена высокая гомология промоторных регионов плазмиды рАН 36-4СРА с промоторами ColE1-типа для РНК I и более низкий уровень гомологии для промоторов РНК II.

В связи с интенсивным использованием плазмидных векторов ColE1-типа производстве ДНК-вакцин, в генной терапии и технологиях создания штаммов с заданными свойствами результаты работы могут быть применены в данной сфере.

## Функциональный анализ генов, контролирующих транспорт цинка у цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803

Женавчук О.Ф., Коробан Н.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119899, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12,  
e-mail: [yennifer.v@gmail.com](mailto:yennifer.v@gmail.com)

Цинк является необходимым элементом для всех организмов и широко распространен в биосфере. Фотосинтезирующим организмам он необходим для транспорта электронов и функционирования многих ключевых ферментов. Для получения Zn в достаточных для метаболизма количествах клетки используют несколько типов белков, которые вовлечены в его связывание и транспорт. Однако при достижении концентраций выше критических Zn токсичен, поэтому у бактерий его внутриклеточная концентрация поддерживается на строго определенном уровне с помощью ряда механизмов, включающих как поглощение, так и выведение. У одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 (далее *Synechocystis*) охарактеризована система выведения ионов Zn из клетки [2]. Ген *ziaA*, кодирует Zn-зависимую АТФазу, функция которой заключается в выведении Zn, а транскрипционный репрессор *ZiaR*, регулирует экспрессию гена *ziaA*. Кроме того, в геноме *Synechocystis* идентифицирован оперон *znuABC*, кодирующий транспортную систему (ABC-транспортёр), предположительно вовлеченную в поглощение Zn [1]. Непосредственно перед опероном *znuABC* расположен транскрибируемый в противоположном направлении ген *znuR*, кодирующий транскрипционный регулятор семейства Fur. Ранее в нашей лаборатории установлено, что инактивация гена *znuR* у *Synechocystis* приводит к дерепрессии оперона *znuABC*. С помощью Нозерн-гибридизации не удалось выявить транскрипты этих генов в клетках дикого типа, независимо от наличия Zn в среде роста. Установлено, что в среде с отсутствием Zn скорость роста мутанта  $\square znuR$  ниже таковой штамма ДТ. В задачи работы входило получение и исследование мутантов с инсерционной инактивацией оперона *znuABC* с целью выявления роли этих генов в контроле транспорта цинка и/или других металлов в клетки *Synechocystis*, а также получение и характеристика мутанта с инактивацией гена *ziaA*. В ходе работы были получены инсерционные мутанты  $\square ziaA$  и  $\square znuA$ . Полная сегрегация мутантов была подтверждена с помощью ПЦР-анализа, и далее был проведен их физиологический анализ.

Для исследования устойчивости мутантов к высоким концентрациям ионов металлов определяли площади зон подавления роста клеток на агаризованной среде вокруг бумажных дисков, содержащих  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  или  $Zn^{2+}$ . Тест не выявил различий между всеми исследованными штаммами, следовательно, транспортная система *ZnuABC* не принимает участия в поглощении данных ионов при высоких концентрациях. Для анализа потребности штаммов в ионах различных металлов применялся подход, основанный на использовании хелатирующих свойств ЭДТА. Чувствительность мутанта  $\square znuA$  к ЭДТА была существенно выше, следовательно, транспортная система *ZnuABC* является необходимой при росте клеток в среде с низкой концентрацией ионов определенного металла/металлов. Для выявления металла, восстанавливающего рост чувствительного к ЭДТА мутанта, на поверхность чашек, содержащих ЭДТА, накладывали бумажные диски, содержащие  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , или  $Zn^{2+}$  и выявляли наличие зон восстановления роста вокруг

дисков. Зоны роста в виде узкого кольца формировались вокруг дисков, содержащих  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  или  $\text{Zn}^{2+}$ , но не  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$ . Эти данные указывают на то, что оперон *znuABC* не отвечает за поглощение  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$ . Учитывая то, что константы связывания  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  с ЭДТА близки, и то, что  $\text{Cd}^{2+}$  не входит в состав ростовой среды BG11 и может присутствовать в ней только в следовых количествах, следует сделать вывод, что оперон *znuABC* отвечает за поглощение  $\text{Co}^{2+}$  и/или  $\text{Zn}^{2+}$ , но не  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$ .

В ходе работы было выявлено наличие двух систем поглощения цинка у *Synechocystis*: высоко- и низкоаффинной. Высокоаффинная система *ZnuABC*, кодируемая опероном *znuABC*, функционирует при дефиците ионов цинка и ей принадлежит ключевая роль в обеспечении цинком клеток *Synechocystis*. Низкоаффинная система транспорта цинка, компоненты которой к настоящему времени остаются неизвестными, активна при достаточной концентрации ионов цинка. Совокупность полученных в работе данных и анализ литературы позволяют предложить гипотетическую схему регуляции гомеостаза цинка у *Synechocystis*. Гомеостаз цинка поддерживается как за счет его поглощения, так и выведения его избытка из клеток, и регулируется, по крайней мере, двумя репрессорами-сенсорами цинка. При голодании по цинку репрессор *ZiaR* является активным и подавляет транскрипцию гена *ziaA*, продукт которого обеспечивает экспорт цинка в периплазму, в то время как репрессор *ZnuR* неактивен, что приводит к дерепрессии системы *ZnuABC*, которая осуществляет высокоспецифичный транспорт цинка в клетку. При достаточной концентрации цинка репрессор *ZiaR* связывает цинк, переходит в неактивную форму и диссоциирует от промотора, в результате чего происходит дерепрессия гена *ziaA* и избыток цинка выводится из клетки. Белок *ZnuR* в присутствии цинка связывается с промотором оперона *znuABC* и подавляет его экспрессию. При достаточной концентрации цинка активна низкоаффинная система транспорта, компоненты которой к настоящему времени остаются неизвестными. Однако, известно, что ген *ziaA* у *Synechocystis* кодирует АТФазу СРх-типа, экспортирующую  $\text{Zn}^{2+}$  [2]. Мутант с инсерционной инактивацией гена *ziaA*, контролирующего экспорт ионов цинка в периплазму, чувствителен к  $\text{Zn}^{2+}$  и может быть использован в качестве удобной модели для функционального анализа генов, контролирующих поглощение ионов цинка. Нами установлено, что мутант с инактивированным геном *ziaA* является чувствительным по сравнению с ДТ не только к  $\text{Zn}^{2+}$ , но и к  $\text{Co}^{2+}$ . Для выявления новых генов, вовлеченных в транспорт ионов цинка, на основе чувствительного к  $\text{Zn}^{2+}$  мутанта  $\Delta\text{ziaA}$  были получены супрессорные мутанты (псевдоревертанты), устойчивые к высоким концентрациям ионов  $\text{Zn}^{2+}$ . Все они оказались в разной степени устойчивыми к высоким концентрациям ионов  $\text{Co}^{2+}$ , в отличие от мутанта  $\Delta\text{ziaA}$ . В настоящее время ведется работа по картированию этих супрессорных мутаций.

### Литература:

1. Pakrasi H.B., Ogawa T. Bhattacharyya-Pakrasi M. (2001) Transport of metals: a key process in oxygenic photosynthesis. – Regulation of Photosynthesis (Aro, E. M., and Andersson, B., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253–264.
2. Thelwell C., Robinson N.J. Turner-Cavet J.S. (1998) An *SmtB*-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 10728-10733.

## **Макет бисенсора проточно-инжекционного типа на основе иммобилизованной алкогольоксидазы для экспресс - определения спиртов**

Зайцев М.Г.

Тульский государственный университет, 300600, Тула, пр. Ленина 92,  
e-mail: [chem@tsu.tula.ru](mailto:chem@tsu.tula.ru)

Для целого ряда областей народного хозяйства задача по выполнению экспресс – анализа содержания спирта в образцах различной природы является актуальной. Так, в области биотехнологии можно отметить задачу, связанную с контролем ферментационных процессов при использовании спиртов метилового и этилового в качестве ростовых субстратов или трансформируемых соединений. Введение в практику экспресс – метода контроля позволит значительно повысить экономическую эффективность и качество ферментационного процесса [1,2].

Наиболее распространенным и надёжным типом биосенсорных устройств являются электрохимические сенсоры на основе кислородных датчиков. Основными достоинствами таких биосенсоров является простота изготовления, высокая стабильность, селективность, чувствительность и воспроизводимость показаний. Биологическое распознавание спиртов осуществляют биорецепторные элементы, сопряженные с кислородным датчиком. Наиболее перспективными являются биорецепторы на основе фермента алкогольоксидазы или целых клеток метилотрофных дрожжей, содержащих данный фермент [3].

Для создания надёжных устройств данного класса в работе были проведены исследования, связанные с поиском, выделением и изучением свойств биоматериалов, а также разработка иммобилизованных биокаталитических препаратов.

В работе использована автоматизированная биосенсорная установка проточно-инжекционного типа, интегрированная с персональным компьютером со специальным программным обеспечением, который позволяет управлять режимами работы (объём отбираемой пробы, скорость подачи пробы, скорость промывки системы буферным раствором, общее время эксперимента), регистрировать, обрабатывать и хранить полученные данные. Датчиками являются кислородные электроды с иммобилизованной алкогольоксидазой. Применяемая аппаратура позволяет осуществлять высокоточные измерения в наноамперном диапазоне токов. Для обработки сигналов использовалось специализированное программное обеспечение Violan 0506.

В ходе работы использовалась методика по иммобилизации алкогольоксидазы, выделенной из *H. polymorpha*, на нитроцеллюлозную мембрану Synrog с помощью бензохинона и ДЭАЭ - декстрана. Полученные биорецепторы отличаются высокой долговременной и операционной стабильностью как при ответе на метанол, так и на этанол. Для анализа использовали как модельные растворы, так и реальные образцы спиртосодержащих жидкостей.

Можно отметить, что коэффициент чувствительности сенсора при ответе на метанол в 2,4 раза выше, а нижняя граница определяемых концентраций ниже, чем при ответе на этанол, это можно объяснить тем, что метанол является природным субстратом алкогольоксидазы, и, соответственно, чувствительность сенсора при ответе на этот субстрат выше.

Линейный диапазон определяемых концентраций для метанола составляет 0,023 до 6,5 мМ, (ПДК для водоёмов хозяйственного пользования составляет 0,09мМ) а для этанола – от 0,055 до 7 мМ (в литературе приводятся данные для

линейного диапазона от 0,5 до 15 мМ) [4] Таким образом, нижнюю границу диапазона определяемых концентраций удалось уменьшить на порядок.

Таблица 1. Сравнительные характеристики сенсора на основе алкогольоксидазы при ответе на этанол и метанол.

Характеристика биосенсора	Субстрат	
	метанол	этанол
Нижняя граница определяемых концентраций, мМ	0,023	0,055
Верхняя граница линейного диапазона определяемых концентраций, мМ	6,5±0,7	7±1
Коэффициент чувствительности, нА/с*мМ	0,60±0,01	0,25±0,01
Падение ответа, на 7-е сутки %	30	27
Время единичного измерения, с	300	300

Была проведена сравнительная оценка определения концентрации этанола в реальных образцах методом газовой хроматографии и биосенсорным методом, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Сравнительная таблица значений концентраций этанола в реальных образцах, определенных биосенсорным методом и методом газовой хроматографии

№ и название образца	Концентрация спирта, %об		
	Заявленная производителем	Биосенсор	Газовая хроматография
1. Вино “Раслинг”	10,5	12±4	10,5±1,5
2. Вино “Ламбада”	10,0	10±1	10,0±0,5
3. Портвейн “333”	18	18±1	18±2
4. Водка “Мягонькая”	40	40±8	37,5±5

Значения концентраций, полученных биосенсорным методом и методом газовой хроматографии, хорошо коррелируют между собой. Разработанная модель биосенсора проточно-инжекционного типа с биорецепторным элементом на основе алкогольоксидазы, иммобилизованной с помощью бензохинона и ДЭАЭ-декстрана позволяет с достаточной точностью определять содержание этанола в спиртосодержащих жидкостях. При этом биосенсорный метод определения этанола отличается простотой аппаратного оформления и существенно меньшим временем единичного анализа. (для биосенсорного метода – 5 мин., для газохроматографического – 25-30мин.)

#### Литература:

1. Решетиллов А.Н. (1996) Модели биосенсоров на основе потенциометрических и амперометрических преобразователей для использования в медицине, биотехнологии, мониторинге объектов окружающей среды (обзор) – Прикладная биохимия и микробиология., 32, 1, 78-93.
2. Azevedo A.M., Prazeres D.M., Cabral J.M., Fonseca L.P. (2005) Ethanol biosensors based on alcohol oxidase – Biosens. Bioelectron., 21, 2, 235-283.
3. Pascual C., Pascual R., Kotyk A. (1982) Use of permeabilized yeast cells for the determination of ethanol and alcohol dehydrogenase assay – Analytical Biochemistry, 123, 205-207.
4. Azevedo A.M., Prazeres D.M.F., Cabral S.M.S, Fonseca L.P. (2005) Ethanol biosensors based on alcohol oxidase – Biosensors and Bioelectronics, 21, 235-247.

## Фенотипическая изменчивость бактерий как фактор регуляции биотехнологических процессов

Клюянова М.А., Сопрунова О.Б.

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Астраханский государственный технический университет», 414025 г. Астрахань, ул. Татищева, 16, e-mail: [klyujanova@mail.ru](mailto:klyujanova@mail.ru)

Известно, что популяция микроорганизмов гетерогенна и характеризуется наличием внутри популяции одного штамма клеток, которые обладают способностью диссоциировать и различаются не только по колониально-морфологическим, но и физиолого-биохимическим свойствам. Внутрипопуляционная изменчивость микроорганизмов в естественных местах обитания обеспечивает адаптацию популяций бактерий к внешним воздействиям и расширяет границы выживаемости вида [3,4].

Особая ситуация из-за явления внутрипопуляционной изменчивости микроорганизмов возникает в микробиологических биотехнологиях. Активность диссоциантов, их физиологические особенности, влияющие на продуцирование биологически активных веществ, различны, что приводит к необходимости контроля за составом возникающей поликультуры [1].

Целью исследований являлось изучение явления диссоциации бактериальных штаммов, изолированных из нефтезагрязненных экосистем Нижнего Поволжья: почв буровых площадок Республики Калмыкия; вод Северного Каспия в районе разведочного бурения нефтяных скважин; почво-грунтов одной из нефтебаз, расположенной в черте города Астрахань.

Выделенные бактериальные штаммы на основании анализа 16 rPHK идентифицированы как *Staphylococcus xylosus* M1, *Pseudomonas aeruginosa* X1, *Bacillus cereus* A1, *Bacillus firmus* SDS-1.

Для выделения и изучения устойчивых признаков колониально-морфологических вариантов и их стабильности в условиях изменения основных компонентов питания использовался ряд специфических для каждого вида бактерий питательных сред.

В результате исследований получено 26 диссоциантов штамма *B. cereus* A1, 14 – *B. firmus* SDS-1, 21 – *Ps. aeruginosa* X1 и 3 – *St. xylosus* M1, которые обладали разнообразием морфотипов колоний (R-, S- и M-типы) и морфологией клеток.

Для *B. cereus* A1 и *B. firmus* SDS-1 характерно практически одинаковое количество R- и S-типов диссоциантов. В популяциях изученных штаммов возможны диссоциативные переходы, которые по способности расщепляться на различные варианты располагаются в следующей последовательности: *B. cereus* A1 - S>R>H>M; *B. firmus* SDS-1 - S>R и *Ps. aeruginosa* X1 - S>M>R>H. Для штамма *Staphylococcus xylosus* M1 характерна только S-форма на всех вариантах сред.

Активность усвоения жидких нелетучих углеводов, определяемая методом лунок по Егорову [5], обнаружена для всех диссоциантов. Наибольшая активность *B. cereus* A1 и *St. xylosus* M1 по отношению к нефти и различным нефтепродуктам

обнаружена у *S*-диссоциантов, *Ps. aeruginosa XI* и *B. firmus SDS-1* – в равной степени у *S*- и *R*-диссоциантов.

Кроме того, отмечено, что многие из выделенных штаммов бактерий эмульгируют нефть. Наибольшая активность отмечена для *R* – типов *B. cereus A1* и *B. firmus SDS-1* (48,89 % и 31,37 % соответственно), *S*- типа *Ps. aeruginosa XI* (52,31 %).

Способность к трансформации нефти, установленная на основании количественного анализа методом измерения массовой доли нефтепродуктов [2], показала, что наиболее активно разрушают нефтяные углеводороды типы диссоциантов, которые обладают наибольшей эмульгирующей активностью.

Полученные в ходе исследований данные свидетельствуют о том, что фенотипическая изменчивость бактерий оказывает существенное влияние на течение микробных трансформаций, и, как следствие, результативность многих биотехнологических процессов, в том числе и в области экологической биотехнологии. Это позволяет рассматривать необходимость использования устойчивых бактериальных популяций микроорганизмов для разработки эффективных способов очистки от широкого круга загрязняющих веществ.

#### **Литература:**

- 1 *Гарейшина М.З., Кузнецова Т.А., Остробоков С.И.* (1991) Влияние закачки аэрированных растворов минеральных солей на микрофлору воды призабойных зон нагнетательных скважин нефтеместорождений – Микробиология, 60, 4, 741-745.
- 2 *Другов Ю.С., Родин А.А.* (2000) Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. – С.-Пб., 2000 – 250с.
- 3 *Милько Е.С., Егоров Н.С.* (1991) Гетерогенность популяций бактерий и процесс диссоциации (корине- и нокардиоподобных бактерий).-М.: Изд-во МГУ, – 144с.
- 4 *Милько Е.С., Ильиных И.А.* (2001) Влияние пониженных концентраций углерода, азота и фосфора в среде на динамику роста трех диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* – Микробиология, 70, 607-610.
- 5 Руководство к практическим занятиям по микробиологии – Под ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ, 1995.

## Повышение термостабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* с помощью направленной эволюции *in vivo*

Кокшаров М.И., Угарова Н.Н.

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Кафедра химической энзимологии, 119991, г. Москва, Россия, Воробьевы горы,  
e-mail: [mkoksharov@enz.chem.msu.ru](mailto:mkoksharov@enz.chem.msu.ru)

Люцифераза светляков (КФ 1.13.12.7) катализирует билюминесцентную реакцию окисления люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ и  $Mg^{2+}$ . Благодаря высокой каталитической активности, специфичности к АТФ и простоте регистрации билюминесцентного сигнала люцифераза светляков применяется в АТФ-метрии, в том числе для определения бактериальных загрязнений различных объектов, используется в качестве гена-маркера экспрессии, в пиросеквенировании и ряде других областей. Применение нативных люцифераз светляков часто ограничивается их низкой стабильностью при повышенных температурах. В частности, люцифераза светляков *Luciola mingrelica* дикого типа при 37°C теряет более половины активности за 15 минут.

Известны работы по увеличению термостабильности люцифераз светляков с помощью случайного и сайт-специфического мутагенеза [1]. Наиболее эффективным оказался метод направленной эволюции – улучшение требуемой характеристики фермента с помощью множества последовательных циклов случайного мутагенеза. Для люциферазы *P. pennsylvanica* таким способом был получен мутант, который даже при 65°C сохранял большой процент каталитической активности за 5 ч [2]. Авторы применяли весьма сложную роботизированную систему. Применив более быструю и простую методику отбора мутантов, в данной работе мы добились существенной термостабилизации люциферазы.

В работе использовали ранее полученный нами мутант S118C люциферазы светляков *L. mingrelica* [3], стабильность которого была выше, чем у фермента дикого типа. Мутагенезу подвергали участок гена, кодирующий со 130 по 391 (из 548) аминокислотные остатки люциферазы. Методом ПЦР пониженной точности была получена библиотека мутантов в векторе pLR3 [3]. Мутантными плазмидами трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-blue, высевали их на чашки Петри с LB-агаром и растили при 37°C в течение 10-12 ч. Для отбора термостабильных мутантов чашки с клетками дополнительно инкубировали при повышенной температуре. При этом происходила инактивация *in vivo* недостаточно стабильных форм люциферазы. Затем клетки обрабатывали раствором люциферина, отбирали наиболее активные мутанты по яркости билюминесценции колоний клеток. Оптимально скрининг до двух тысяч колоний на 90 мм чашку. Поскольку в данных условиях не происходит гибели клеток, нет обычной необходимости изготовления реплик мутантной библиотеки. Было проведено четыре цикла мутагенеза: наиболее стабильный мутант, полученный в предыдущем цикле, использовался как исходный в следующем. В первом цикле скрининг по активности проводили непосредственно после роста клеток при 37°C, во втором и третьем – после инкубации в течение 40 мин при 50°C, в четвертом – после 40 мин при 55°C. Показано, что после скрининга 500-1500 колоний обычно можно выявить 1-3 мутанта, заметно более стабильных, чем основная масса. После 4-го цикла был получен наиболее стабильный мутант 4T1, колонии которого сохраняли заметное свечение даже после 20 мин инкубации при 60°C.

Для получения препаративных количеств люциферазы мутант 4T1 был переклонирован в плазмиду системы pET, и была проведена наработка и очистка

фермента по описанной ранее методике [3]. Как показано ниже, мутант 4Т1 имеет более высокую удельную активность, а термостабильность при 42°С в 70 раз выше, чем у люциферазы дикого типа (WT).

Фермент	Удельная активность, % WT	Выход, мг на 100 мл культуры	$t_{1/2}$ (42°С), ч
WT	100	13	0,14
4Т1	170	16	9,9

При 37°С люцифераза инактивируется по двухстадийному механизму (Рис. А), а при более высоких температурах – по одностадийному. На Рис. 1Б показана зависимость константы скорости инактивации («медленной» стадии, затем единственной при одностадийном механизме) в интервале температур 33-50°С в координатах Аррениуса. Можно видеть, что во всем этом диапазоне мутант значительно стабильнее люциферазы дикого типа.

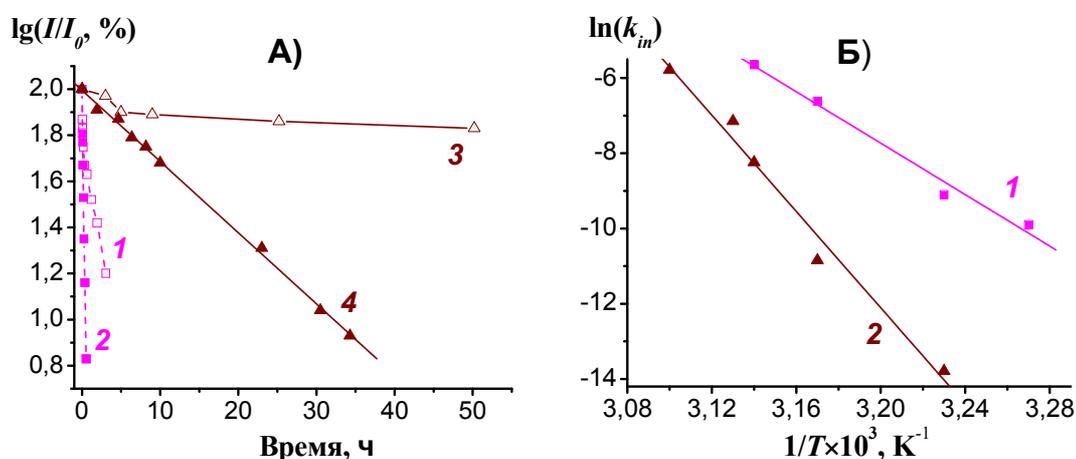


Рис. 1. Термоинактивация WT- и мутантной люцифераз. А) Кинетические кривые термоинактивации WT (кривые 1 и 2) и 4Т1 (кривые 3 и 4) при 37 и 42°С соответственно; Б) Зависимость константы инактивации от температуры в координатах  $\ln(k_{in})-1/T$  для WT (1) и 4Т1 (2) в интервале 33-50°С.

Обычно люциферазы используются в диапазоне температур от комнатной до 37°С. В то время как у WT-люциферазы при 37°С активность за четыре часа падает до 10%, мутант 4Т1 через 2 суток всё ещё сохраняет 70% активности, т. е. его стабильность достаточна для большинства практических применений.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (Грант 08-04-00624)

### Литература:

1. White P.J., Squirrell D.J., Arnaud P., Lowe C.R., Murray J.A. (1996) Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354 – *Biochem J.*, 319, 343-350.
2. Wood K.V., Hall M.P., Wood M.G. (2007) Thermostable luciferases and methods of production – United States Patent №7241584.
3. Кокшаров М.И., Угарова Н.Н. (2008) Случайный мутагенез люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Мутантные формы фермента, спектры биолюминесценции которых малочувствительны к изменению рН – *Биохимия*, 74, 8, 1071-1080.

## Многоцелевой устойчивый биокатализатор на основе иммобилизованных клеток актинобактерий рода *Rhodococcus*

Криворучко А.В.

Пермский государственный университет, 614990 г. Пермь, ул. Букирева 15,  
e-mail: [nast@iegm.ru](mailto:nast@iegm.ru)

Основная биологическая особенность актинобактерий рода *Rhodococcus* – способность к окислительной трансформации широкого спектра гидрофобных соединений, в том числе природных и антропогенных углеводов. Данное свойство и многие другие особенности (олигокарбо- и нитрофилия, наличие липофильной клеточной стенки, синтез и аккумуляция эндогенных резервных веществ в качестве дополнительных энергетических субстратов, способность продуцировать биосурфактанты, расти при низких температурах и в широком диапазоне активной кислотности, склонность к высокой клеточной дифференции, колонизации поверхностей, клеточной агрегации) родококков делают их наименее зависимыми от внешней среды, позволяют существовать в неблагоприятных условиях и обуславливают повышенный интерес к ним как объекту промышленного использования. Реализация биотехнологического потенциала родококков требует разработки устойчивых биокатализаторов и обеспечения их гарантированной функциональной стабильности. Один из известных способов повышения стабильности биокатализаторов на основе живых бактериальных клеток – использование приема иммобилизации.

Цель настоящей работы – разработка многоцелевого биокатализатора на основе иммобилизованных клеток родококков. Нами апробирован метод адсорбционной иммобилизации клеток родококков на твердых носителях. В качестве носителей испытаны доступные в регионе материалы на основе древесных опилок, куриных перьев и отходов кожевенного производства. Для повышения сродства поверхности адсорбентов к клеткам родококков и углеводородному субстрату впервые использован прием гидрофобизации носителей с помощью различных гидрофобизаторов (*n*-гексадекана, *Rhodococcus*-биосурфактантов, силиконовой эмульсии или олифы). При этом экспериментально обоснована целесообразность использования в качестве наиболее эффективных гидрофобизаторов *Rhodococcus*-биосурфактантов (1:0,1) или олифы (1:0,2).

Прикладная задача использования иммобилизованных клеток родококков для повышения скорости биодegradации гидрофобных субстратов потребовала решения фундаментальной проблемы, связанной с изучением адгезивных свойств родококков, а также физико-химических и биологических факторов, регулирующих адгезию. По сравнению с медико-биологическими агентами данные процессы в отношении родококков изучены слабо, поскольку они являются относительно молодым объектом биотехнологии.

Нами исследованы адгезионные характеристики родококков из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, номер в WFCC 768, [www.iegm.ru/iegmcol/strains/](http://www.iegm.ru/iegmcol/strains/)). Путем постановки *in vitro* неспецифического Tn5 мутагенеза получена библиотека Tn5 мутантов родококков, обладающих различной адгезивной и эмульгирующей активностью. Методами МАТН (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) и МАТС (Microbial Adhesion to Solvents) исследованы степень гидрофобности, заряд клеточной поверхности родококков, влияющие на их адгезивные свойства. Впервые с использованием методов профилометрии высокого разрешения с помощью интерференционного микроскопа New View 5000 (Zygo, США) и инфракрасного сканирования с помощью камеры

CEDIP Silver 450M (CEDIP Infrared Systems, Франция) исследованы кинетика и термодинамика процесса адсорбции клеток родококков на поверхности используемых носителей.

В результате проведенных исследований отобран штамм *R. ruber* ИЭГМ 231 с максимальной (85% прикрепленных клеток) адгезивной активностью. Выявлено стимулирующее (в 1,8-2,3 раза) влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов на процесс адгезии родококков. Подобраны оптимальные величины удельной поверхности и гидрофобности носителей, обеспечивающие максимальную адсорбционную емкость используемых носителей. Определены контролируемые условия мономерного распределения клеток родококков на носителе, обеспечивающие максимальную скорость разложения различных гидрофобных субстратов. На основе адсорбированных на модифицированном опиле клеток родококков получен лабораторный образец многоцелевого устойчивого биокатализатора. В экспериментах с использованием модельной почвы, а также в условиях лабораторного биореактора оптимизированы процессы окислительной биодеструкции нефтяных углеводородов и карбоциклических соединений, содержащих в молекуле фенольную гидроксильную группу (парацетамола, в частности). Как видно из приведенной таблицы, разработанный биокатализатор характеризуется высокой каталитической активностью закрепленных клеток родококков, стабильностью при хранении в течение 8 месяцев, возможностью повторного использования и отвечает основным требованиям промышленной биотехнологии. При этом исходным сырьем для его изготовления является относительно дешевый, доступный материал, представляющий собой отходы деревообрабатывающей промышленности.

#### Технологические параметры многоцелевого биокатализатора на основе адсорбированных на модифицированном опиле клеток родококков

Параметр	Носитель обработан олифой	Носитель обработан био-сурфактантом
Диаметр частиц биокатализатора, мм	1-3	
Адсорбционная емкость, мг сухих клеток / г носителя	46,0±4,60	29,0±1,60
Водопоглощающая способность, г H <sub>2</sub> O / г носителя	1,2±0,09	1,5±0,02
Сорбционная влажность, г паров H <sub>2</sub> O / г носителя	0,3±0,01	0,3±0,03

Каталитическая активность в отношении, мг окисленного субстрата / л / ч :

<i>n</i> -гексадекана	104±2	43±4
сырой нефти	31±1	28±3
парацетамола	–	116±32
Продолжительность хранения без потери функциональной активности, мес	8	
Количество циклов повторного использования	2	

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 07-97612-р\_офи, INTAS 01-2151, NATO ESP.NR.NRCLG 982051 и ФЦНТП по приоритетному направлению «Живые системы» (207-2-1.2-03-01-379).

## **Анализ экологического разнообразия штаммов *Legionella pneumophilla* посредством молекулярно-генетического типирования бактерий**

Кунда М.С.<sup>1</sup>, Воронина О.Л.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18,  
[e-mail:markunda@rambler.ru](mailto:markunda@rambler.ru)

<sup>2</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский пр., 33

**Введение.** Бактерии *Legionella pneumophilla* представляют собой грамотрицательные неспорообразующие палочки. Они относятся к так называемым условно-патогенным микроорганизмам и способны вызывать заболевание острой респираторной природы, называемое легионеллезом. Во многих европейских странах наблюдается увеличение случаев заболевания легионеллезом: число заболевших на миллион человек увеличилось с 3,35 в 1994 году до 11,2 в 2006 году.

Исследование возможных природных экологических ниш возбудителя показало его широкое распространение в водной среде. Поэтому в задачу нашего исследования входило молекулярно-генетическое типирование штаммов *L. pneumophilla*, выделенных из окружающей среды, и оценка их разнообразия.

**Материалы и методы.** Материалами исследования послужили штаммы *L. pneumophila* из коллекции НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Gamaleya Institute Collection of Legionellosis, (GICL)).

Генотипирование проводили с использованием SBT схемы, разработанной EWGLI. Схема предполагает секвенирование и анализ следующих операционных генов *L. pneumophila*: *flaA*, *pile*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA* и *neuA*. По данным секвенирования представителями EWGLI создана база последовательностей фрагментов по каждому гену (SBT database (version 3.0)). По версии создателей базы, каждая такая последовательность называется аллель. Сравнение с базой данных позволяет записать аллельный профиль штамма, перечисляя в установленном порядке (*flaA*, *pile*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA*, *neuA*) номер аллеля, с которым обнаружено 100% сходство, для каждого из 7-и генов.

Секвенирование фрагментов ДНК проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems / Hitachi). Анализ последовательностей и выравнивание выполняли с помощью программы CLUSTAL W (1.83).

**Обсуждение и результаты.** Аллельные профили проанализированных штаммов представлены в таблице 1. Их можно разделить на три группы. Первую группу составляют коллекционные образцы из различных штатов США. Из данных таблицы 1 видно, что штаммы Bloomington -2 и Bellingham-1, выделенные из озерной воды в штатах Indiana и Washington, соответственно, обладают сходными аллельными профилями, несмотря на значительное расстояние между местами забора проб. В то же время штамм Chicago-8, выделенный из соскоба с насадки душа в штате Illinois, сходен со штаммом Bloomington -2 всего по двум аллелям, хотя штаты Illinois и Indiana расположены рядом друг с другом.

Вторая группа представлена штаммами TOTAL, BLR-05, Pyshma-3, болгарским штаммом Sophia. Из 12-ти штаммов TOTAL девять имеют идентичный аллельный профиль, совпадающий с профилем штамма TOTAL-11, выделенного непосредственно из воды скважины. Штамм TOTAL-1, изолированный первым,

отличается по одному аллелю. По мишени *pilE* сходные между собой штаммы TOTAL-4 и TOTAL-5 отличны от остальных штаммов TOTAL. Следует отметить, что штаммы TOTAL-4 и TOTAL-5 выделены из проб воды, отобранных в разных зонах объекта с 2-х недельным интервалом. Штамм BLR-05, изолированный из частного бассейна Московской области, отличается от 9-ти штаммов группы TOTAL по одному аллелю, болгарский штамм Sophia – по 3-м аллелям. Штамм Pyshma-3, выделенный из соскоба с душевой насадки, только по одному аллелю отличен от штамма TOTAL-1. Анализ литературы показал, что штамм, сходный с TOTAL-1 по 6-ти позициям аллельного профиля (301BP: 6, 10, 19, 3, 19, 4), был идентифицирован японскими исследователями. Atemura-Maekawa J. *et al.* выделили его из воды спа-бассейна в одном из районов Японии. Таким образом, штаммы подобного аллельного профиля характерны для водных источников всей Евразии.

Третью группу составляют штаммы Draginovo-1, Draginovo-2 и Volgaria, изолированные из воды озера, расположенного около минеральных источников курорта Велинград в Болгарии. Все они имеют идентичный аллельный профиль.

Проведенное исследование показало различие аллельных профилей штаммов двух континентов, а также наличие в Евразии особых экологических изолятов в водных источниках горной местности. Дальнейшая работа по мониторингу экологических изолятов послужит не только контролю эпидемиологической обстановки, но и своевременному выявлению возбудителя заболевания как при спорадических случаях, так и при вспышках легионеллеза, связанных с путешествиями.

Таблица 1. Аллельные профили штаммов *L. pneumophila*, выделенных из окружающей среды

штамм	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	Источник, авторы, год
Bloomington-2	7	6	17	20	13	11	3	USA, Indiana, Politi B.D. <i>et. al.</i> , 1979
Bellingham-1	7	6	17	3	24	11	11	USA, Washington, Stout J.E <i>et. al.</i> , 1988
Chicago-8	2	6	17	14	12	8	6	USA, Illinois, Bibb W. F. <i>et. al.</i> , 1983
BLR-05	6	10	19	28	19	4	6	Россия, Московская обл., Карпова Т.И., Тартаковский И.С. 15.06.2005
Pyshma-3	6	10	15	3	19	4	3	Россия, г. Верхняя Пышма, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. 30.07.2007
TOTAL-1	6	10	19	3	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. 20.10.2006
TOTAL-2	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. 28.07.2007
TOTAL-3	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. 15.10.2007
TOTAL-4	6	6	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. 15.10.2007
TOTAL-5	6	6	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. 30.10.2007
TOTAL-6	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. 30.10.2007
TOTAL-7	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. январь 2007

штамм	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>tompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	Источник, авторы, год
TOTAL-8	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дроница Ю.Е. январь 2007
TOTAL-9	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дроница Ю.Е. январь 2007
TOTAL-10	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дроница Ю.Е. 20.03.2008
TOTAL-11	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дроница Ю.Е. 20.03.2008
TOTAL-12	6	10	19	28	19	4	3	Россия, Ханты-Мансийск, Карпова Т.И., Дроница Ю.Е. 20.03.2008
Sophia	6	10	19	28	21	14	9	Bulgaria, Sophia, Tomov A. et. al, 1987
<b>Draginovo-1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>40</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>Bulgaria, Velingrad, Tomov A. et. al, 1981</b>
<b>Draginovo-2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>40</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>Bulgaria, Velingrad, Tomov A. et. al, 1981</b>
<b>Bolgaria</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>40</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>Bulgaria, Velingrad, Tomov A. et. al, 1981</b>

## **Разработка высокопроизводительного роботизированного скрининга для направленной эволюции $\alpha$ -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens***

Лавров К.В., Яненко А.С.

ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
Москва, 1-ый Дорожный пр., 1, e-mail: [yanenko@genetika.ru](mailto:yanenko@genetika.ru)

Лабораторная (направленная) эволюция ферментов использует один из природных механизмов генерации биологического разнообразия, а именно равномерное внесение случайных мутаций и отбор нужных вариантов из большого числа мутантов. Высокопроизводительный скрининг ферментативной активности микроорганизмов позволяет реализовывать такой отбор в лабораторных условиях.

Для создания методики использована  $\alpha$ -амилаза *B. amyloliquefaciens*, клонированная на бирепликонном векторе p19-1418 (Рябченко, неопубл.), поддерживаемом в *E. coli*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*. Такая конструкция пригодна для экспрессии активного фермента как в *E. coli*, так и в видах *Bacillus*.

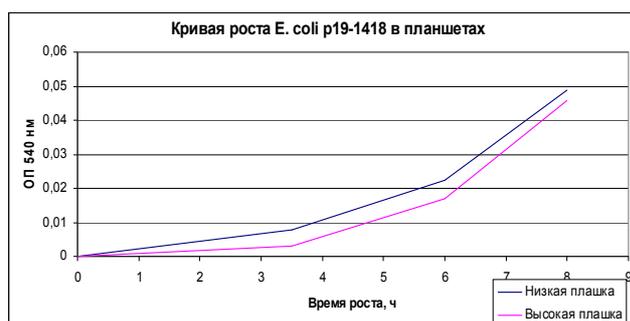
### **Этапы скрининга:**

1. Перекол отдельных колоний трансформантов *E. coli* p19-1418 и перенос в планшеты 96 лунок (на роботе QpixII, Genetix), в бульон ЛБ
2. Предвыращивание культуры в планшете («посевная культура»)
3. Перенос аликвот культур в планшеты с бульоном ЛБ, содержащим крахмал (на роботе Aquarius, Tecan), и выращивание с экспрессией амилазы
4. Закладку копий выращенных культур на низкотемпературное хранение
5. Отбор аликвот культур в планшеты (на роботе Aquarius, Tecan) для измерения оптической плотности клеток (на планшетном спектрофотометре Safire2, Tecan)
6. Постановка реакции гидролиза растворимого крахмала в планшетах (на роботе Aquarius, Tecan)
7. Отбор аликвот реакционной смеси и окрашивание их йодом в планшетах (на роботе Aquarius, Tecan), измерение ОП йодо-крахмального комплекса (на планшетном СФ Safire2, Tecan)
8. Расчёт удельных активностей клонов и выбор наиболее активных с использованием аппарата формул и макросов Microsoft Excel.

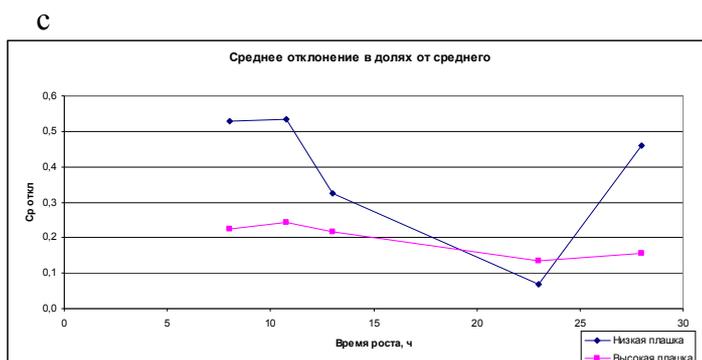
### **Создание методики включало:**

1. Исследование поведения культуры *E. coli* p19-1418 на всех этапах скрининга и оптимизацию условий пересевов и выращиваний;
2. Выбор оптимальной для роботизации методики измерения амилолитической активности
3. Создание новой методики измерения амилолитической активности йодо-крахмальным способом, пригодной для автоматизации на робототехнике;
4. Написание и отладку протоколов (программ) работы роботов QpixII и Aquarius для максимально точного выполнения методик
5. Написание и отладку формул и макросов Excel для расчетов

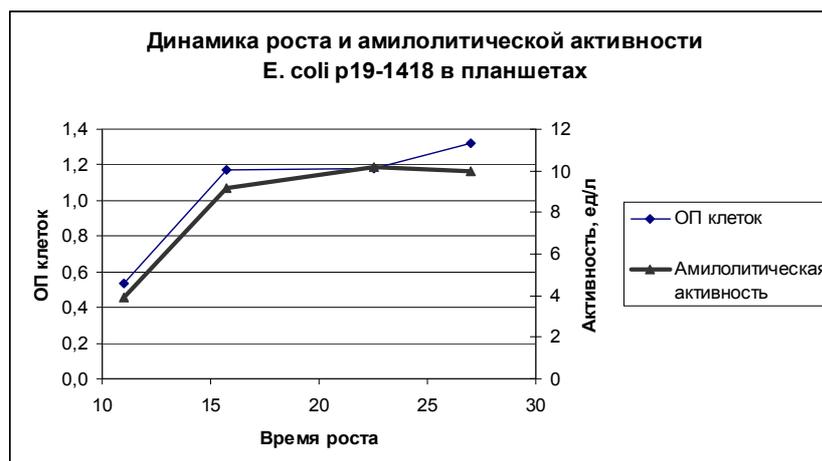
Мы показали, что предвыращивание трансформантов для получения экспоненциальной посевной культуры оптимально в течении 4-5 часов:



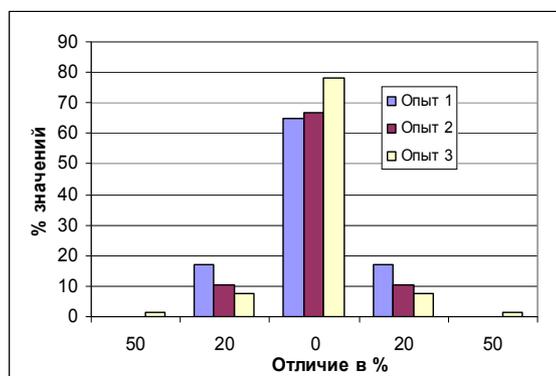
Исследование условий выращивания культуры с накоплением амилазы показало, что высокие планшеты с объемом лунки 2,2 мл оптимальнее, чем низкие планшеты с объемом лунки 350 мкл, что отражается в большей однородности оптических плотностей культур в лунках:



Также было показано, что оптимальное (необходимое и достаточное) время для выращивания культур для накопления амилазы – 16-20 часов:



По результатам измерения удельной амилалитической активности культур, выращенных в планшетах, была выявлена степень однородности повторностей в лунках. Гистограмма демонстрирует, что 70-80% параллельных лунок отличаются друг от друга не более, чем на 20% (меньшая от большей). Около 20 % лунок отличаются друг от друга не более, чем на 50%, и не более 3% лунок отличаются друг от друга более, чем на 50%.



Вышеприведённые данные показывают, что данная процедура пригодна для скрининговых исследований по отбору мутантов с превышением активности. Надёжный отбор возможен, если активность мутанта превышает исходную на 20 % и более.

## Роль сенсорных РНК в регуляции клеточного метаболизма

Лобанов К.В., Миронов А.С.,

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545 Россия, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д.1. e-mail: [alexmir@genetika.ru](mailto:alexmir@genetika.ru), [lobanov@genetika.ru](mailto:lobanov@genetika.ru)

Сенсорные РНК – это тип регуляторных лидерных РНК, которые выступают в качестве сенсоров специфических метаболитов — малых молекул (витамины, аминокислоты, азотистые основания и нуклеозиды) и напрямую, без белковых посредников, регулируют транскрипцию или трансляцию соответствующих мРНК. (Рис.1)

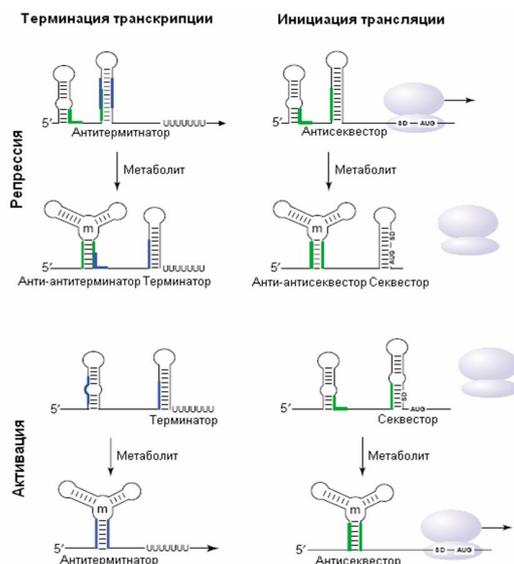


Рис. 1. Схема регуляции экспрессии генов с участием сенсорных РНК

**Целью настоящей работы** является изучение сенсорной РНК, кодируемой геном *pbuE* у *Bacillus subtilis*, а так же поиск новых сенсорных РНК.

Ген *pbuE* *B. subtilis* кодирует синтез трансмембранного белка, ответственного за транспорт из клетки пуриновых оснований и локализуется на 53.50<sup>о</sup> хромосомной карты. Лидерные области ряда генов пуринового метаболизма у *B. subtilis* содержат консервативную последовательность (G-бокс), которая способна выступать в качестве сенсора пуриновых оснований, и расположенный за ней классический Rho-независимый терминатор транскрипции

На модели гена *xpt* *B.subtilis* было показано, что вторичная структура лидерной мРНК подвержена конформационным изменениям: в присутствии эффекторов — гуанина (G) или гипоксантина (H) происходит формирование терминатора транскрипции, а в их отсутствии — антитерминатора, обеспечивающего сквозную транскрипцию структурной части гена. Очень похожая на G-бокс нуклеотидная последовательность была обнаружена и в лидерной области гена *pbuE*. Сравнение нуклеотидной последовательности лидерной мРНК генов *xpt* и *pbuE* обнаруживает большую гомологию, особенно в участках, расположенных между шпильками и выявляет возможность формирования трех потенциальных шпильчатых структур. Более того, выяснилось, что лидерная мРНК гена *pbuE* также выполняет сенсорную функцию, но, в отличие от G-бокса гена *xpt*, эффектором этой мРНК служит не G или H, а аденин (A), поэтому аптамерный участок лидерной мРНК гена *pbuE*

получил наименование А-бокса. Другая интересная особенность А-бокса состоит в том, что в присутствии А наблюдается не репрессия, а активация транскрипции гена *pbuE*. Таким образом, если в случае гена *xpt* добавление экзогенных G и H стабилизирует терминирующую шпильку, то в случае гена *pbuE* присутствие А приводит к такому изменению конформации лидерной области, при которой структура терминатора транскрипции разрушается и обеспечивается сквозная транскрипция структурной части гена. Любопытно, что в областях лидерной мРНК, расположенных между шпильками, нуклеотидные последовательности гуанин-регулируемой *xpt* мРНК и аденин-регулируемой *pbuE* мРНК обнаруживаются всего три различия. Примечательно, что одно из различий это основание 75С, в гуанин-регулируемой *xpt* мРНК (G-бокс) и основание 70U в аденин-регулируемой *pbuE* мРНК (А-бокс). Было высказано предположение, что именно это различие определяет специфичность связывания соответствующих аптамеров с метаболитами-эффекторами, так как G и H может спариваться с основанием 75С в G-боксе, тогда как А – с основанием 70U в А-боксе в результате классического Уотсон-Криковского взаимодействия.

Проведенный сайт-направленный мутагенез лидерной области гена *pbuE* *B. subtilis* полностью подтвердил это предположение. Показано, что присутствие в консервативной области лидера (А-бокс) двух нуклеотидных замен 70U→С и А100→G приводит к изменению специфичности сенсорной РНК: вместо аденина позитивным эффектом транскрипции становится гуанин (Рис.2).

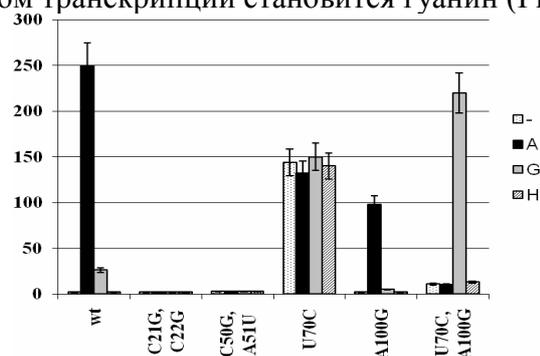


Рис. 2. Влияние пуриновых оснований на экспрессию лидера *pbuE* дикого типа и его мутантных вариантов

Поиск новых сенсорных РНК был предпринят на модели гена *ygjT* *Escherichia coli*, экспрессия которого обнаруживает зависимость от рН среды. Экспрессия данного гена резко увеличивается в условиях высоких значений рН, однако механизм, лежащий в основе этой регуляции до настоящего времени остается неизвестным. Исходя из первичной структуры продукта гена *ygjT*, предполагается, что он является трансмембранным белком с неизвестными функциями. Предварительный анализ регуляторной области гена *ygjT* показал вероятное наличие двух терминаторов, а так же сайт связывания белка СрхR. Данные, полученные в результате опытов по проведению транскрипции регуляторной области гена *ygjT* в системе *in vitro* полностью подтвердили предварительные предположения. С помощью сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные варианты лидерной области гена *ygjT* *E. coli*, содержащие точечные замены в первом и втором терминаторе, а также делецию всей регуляторной области. С помощью фьюзов *ygjT-lacZ*, содержащих полученные мутации, показано, что рН-зависимая экспрессия гена зависит от аллельного состояния гена СрхR и, кроме того, регулируется на уровне терминации транскрипции. Показано, что первый терминатор играет важную роль в рН-контроле экспрессии гена *ygjT*. Однако, вопрос участия сенсорных РНК в регуляции экспрессии гена *ygjT* требует дальнейшего изучения.

## Использование комбинированных видов мутагенеза для получения мутантов дрожжей - продуцентов лимонной кислоты

Лунина Ю.Н., Пунтус И.Ф., Камзолова С.В., Моргунов И.Г.  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, 142292 г.  
Пушино, Московской обл., просп. Науки 5, e-mail: [luninaj@rambler.ru](mailto:luninaj@rambler.ru)

Долгое время считалось, что только мицелиальные грибы способны продуцировать ЛК. В 60-е годы прошлого века было показано, что алканутилизирующие дрожжи *Candida (Yarrowia) lipolytica* также способны накапливать ЛК при определенных условиях [1-3]. В отличие от традиционных продуцентов - условно-патогенных грибов *Aspergillus niger*, дрожжи *Y. lipolytica* экологически безопасны, их можно культивировать в глубинных условиях, они могут использоваться в качестве источника углерода широкий спектр субстратов (н-алканы, этанол, глюкоза, растительные масла). Однако, *Y. lipolytica* наряду с ЛК синтезируют и изоформу ЛК - изолимонную кислоту (ИЛК).

Целью настоящей работы являлось получение мутантных штаммов *Y. lipolytica*, обладающих повышенной способностью к синтезу ЛК из глюкозы, а также низким содержанием побочного продукта ИЛК, и изучение их физиолого-биохимических особенностей в сравнении с природным штаммом.

Природный штамм *Y. lipolytica* 704 облучали ультрафиолетом (УФ) или обрабатывали мутагеном N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ) и проводили отбор вариантов на отсутствие роста культур в среде с ацетатом. Скрининг ацетат – негативных мутантных штаммов предполагает отбор форм, утративших способность к росту на ацетате, которые, как правило, характеризуются различными нарушениями в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). В результате скрининга из 1500 колоний было отобрано 16 вариантов, отличающихся слабым ростом на твердой среде с ацетатом. Они подвергались отбору на селективных средах с мелом и индикатором бромкрезолом. В основу подготовки среды для экспресс-методов положены три основных признака: избыток глюкозы, лимитирующая концентрация азота (60 мг/л) и использование только органического источника азота (дрожжевого автолизата) вместо сульфата аммония. В процессе выделения кислот вокруг колоний появлялись различные по величине зоны растворения мела, соответствующие количеству образующихся кислот. Были отобраны 4 мутантных штамма, облученные УФ (УФ 4-1; УФ 5; УФ 5-1; УФ 5-6) и 4 мутанта, обработанные НГ (НГ 40-5; НГ 40-6; НГ 60-2; НГ 80-4).

В ходе дальнейшего их отбора в жидкой среде Ридер с глюкозой в условиях дефицита азота было получено только 3 мутанта (УФ 5, НГ 40-6 и НГ 80-4), которые отличались более высокой продуктивностью синтеза ЛК из глюкозы (в среднем на 23,0 % выше) в сравнении с исходным штаммом. При комбинированном воздействии мутагенов УФ и НГ из 1000 колоний были селекционированы еще 3 мутанта (№15, №19 и №22), кислотообразующая активность которых до 43,9% выше по сравнению с исходным штаммом. Выход  $Y_{ЛК}$  у всех высокопродуктивных мутантов был более 43,0%, и значительно выше величины, представленной другими авторами для мутантов *Y. lipolytica* (19,0 %) при росте на среде с глюкозой [4]. У мутанта 15, полученного при повторной обработке УФ-мутантов НГ, величина продуктивности была выше на 43,9%.

Последующая работа проводилась в ферментере. Проведено сравнение физиолого-биохимических особенностей роста и синтеза кислот у природного штамма *Y.lipolytica* 704 и мутанта №15. При лимитировании роста клеток азотом мутант № 15 на 72 ч роста накапливает 57,7 г/л ЛК, в то время как исходный штамм - 45,0 г/л (рис. 1). У мутанта *Y. lipolytica* № 15 продуктивность процесса, удельная скорость синтеза ЛК и выход были высокими и составляли 0,862 г ЛК/л·ч, 0,054 г ЛК/г клеток·ч и 49,7%, соответственно.

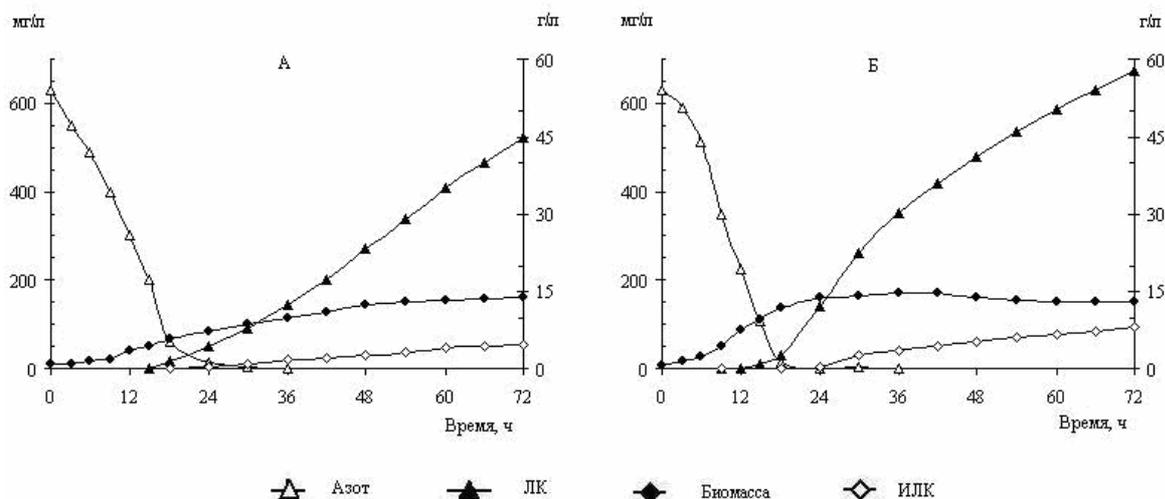


Рис. 1. Биосинтез ЛК у природного штамма *Y. lipolytica* 704 (А) и мутанта №15 (Б).

Мутантный штамм №15 обладает по всей вероятности генетическими изменениями, в том числе измененными свойствами ферментов транспорта или катаболизма субстратов.

Анализировалась активность ферментов ЦТК, участвующих в образовании ЛК и ее дальнейшем превращении: цитрат-синтаза, аконитат-гидратаза, НАД- и НАДФ-зависимые изоцитрат дегидрогеназы. Клетки отбирали в двух фазах: экспоненциального роста (1) и активного кислотообразования (2). Результаты представлены в Табл. 1.

Таблица 1. Активность ферментов (Е/мг белка) ЦТК в клетках дрожжей *Y. lipolytica* 704 и мутанта №15 в среде с глюкозой:

Фермент	Фаза роста	<i>Y. lipolytica</i> 704	Мутант №15
Цитрат-синтаза	1	1,15	1,25
	2	1,93	2,2
Аконитат-гидратаза	1	1,09	0,59
	2	0,60	0,30
НАД-изоцитрат-дегидрогеназа	1	0,94	0,12
	2	0,23	0,27
НАДФ-изоцитрат-дегидрогеназа	1	0,18	0,14
	2	0,25	0,23

Таким образом, у исследуемых штаммов накопление ЛК, а не других метаболитов, вероятно, является результатом высокой, в сравнении с последующими ферментами, активностью цитрат-синтазы. Повышенная интенсивность образования ЛК и низкое содержание ИЛК у мутанта, в сравнении с исходным штаммом, обусловлена, более высоким уровнем активности цитрат-синтазы и значительно сниженной активностью аконитат-гидратазы и НАД- и НАДФ-изоцитратдегидрогеназ.

#### **Литература:**

1. *Финогенова Т.В., Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Чернявская О.Г.* (2005) – Прикл. биохимия и микробиология, 41, 5, 478-486.
2. *Лозин А.Б., Финогенова Т.В.* (1972) – Журн. Всес. хим. общества им. Д.И. Менделеева 17, 5, 526-532.
3. *Финогенова Т.В., Илларионова В.И., Лозин А.Б.* (1973) – Микробиология, 42, 5, 790-794.
4. *Papanikolaou S., Aggelis, G.* (2002) – Bioresource Technol., 82, 1, 43-44.

## Поиск грибов – продуцентов L-лизин- $\alpha$ -оксидазы

Макрушин К.В.<sup>1,2</sup>, Аринбасарова А.Ю.<sup>2</sup>, Меденцев А.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Пуцинский Государственный Университет, 142290, Московская обл., г. Пушино.

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН, 142290, Московская обл., г. Пушино, ул. Институтская, 5.  
e-mail: [makr82@rambler.ru](mailto:makr82@rambler.ru)

Широта спектра онкологических заболеваний делает необходимым разработку новых противоопухолевых средств. Одним из препаратов, перспективных в энзимотерапии опухолей, является L-лизин- $\alpha$ -оксидаза (ЛО) (К.Ф.1.4.3.14), в присутствии которой происходит деградация незаменимой в человеческом организме аминокислоты L-лизина. В настоящее время в клинической онкологии применяется единственный противоопухолевый фермент L-аспарагиназа, который эффективен при лечении лейкоза [1]. Лекарственный препарат на основе ЛО позволит расширить диапазон терапевтического использования противоопухолевых ферментов.

Оксидазы L-аминокислот широко распространены в природе и обнаружены у животных [2] и микроорганизмов [3-6]. Среди грибов этот фермент был найден у *Neurospora crassa* [3], *Aspergillus niger* [5], а также у некоторых видов *Trichoderma* [5,6]. Следует отметить, что только у грибов рода *Trichoderma*, в отличие от других продуцентов, фермент определен как внеклеточный. Впервые ЛО получили японские исследователи путем культивирования гриба *Trichoderma viride* [5]. С тех пор они являются монополистами в мире по производству фермента. Это объясняется, в первую очередь, отсутствием активного штамма-продуцента, который мог бы составить конкуренцию *T. viride*. Имеющиеся в литературе данные немногочисленны и касаются, в основном, биологических свойств ЛО.

Цель данной работы состояла в поиске грибов - активных продуцентов внеклеточной L-лизин- $\alpha$ -оксидазы.

В процессе поиска продуцента использовали 14 музейных штаммов *Trichoderma*, полученных из ВКМ (ИБФМ РАН): *T. harzianum* Rifai ВКМ F-1959, *T. longibrachiatum* Rifai ВКМ F-2025, *T. virens* ВКМ F-1117, *T. aureoviride* ВКМ F-2026, F-2027, *T. viride* ВКМ F-2721, F-1130, F-1132, F-1133, F-1134, F-1135, F-2430, F-2587, *T. koningli* ВКМ F-2429. Кроме того, были протестированы 8 штаммов грибов, выделенных из образцов почв лесного массива г. Пушино. Предварительные исследования (цвет и форма колоний) давали основания отнести эти культуры к роду *Trichoderma*.

Накопительные культуры получали на стерильных сухих пшеничных отрубях (10 г) (нескольких пассажей) с последующим рассевом на агаризованной среде, содержащей измельченные отруби (10%) и NaNO<sub>3</sub> (5%). Выросшие колонии обрабатывали раствором, содержащим L-лизин (2 мМ), о-дианизидин (0.1 мМ) и пероксидазу (5 мкг/мл).

Грибы из побуревших колоний и музейные штаммы тестировали на способность к синтезу ЛО. Культивирование осуществляли при 28<sup>0</sup>С в течение 15 дней при периодическом встряхивании.

Оказалось, что все исследуемые штаммы активно росли на сухих пшеничных отрубях (визуальное определение), как в присутствии, так и отсутствии солей

неорганического азота, но в разной степени продуцировали ЛО. Способность к биосинтезу внеклеточной ЛО проявили 3 музейных штамма, а также почвенный изолят *Trichoderma* sp. 6 (Таблица). Наибольший синтез ЛО отмечался у *Trichoderma* sp. 6, который в присутствии  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  достигал 60 Е/г субстрата. В присутствии других солей азота уровень активности ЛО был в несколько раз ниже.

Способность к синтезу ЛО была показана ранее также для *T. aureoviride* Rifai ВКМ F-2026, *T. longibrachiatum* ВКМ F-2025, *T. harzianum* Rifai, *Trichoderma* sp. ВКМ F-2030 [6]. ЛО активность указанных штаммов была ниже по сравнению с активностью найденного нами природного штамма.

Т.о. в результате поиска продуцентов внеклеточной ЛО среди грибов рода *Trichoderma* найдены 4 штамма, среди которых наиболее активным оказался штамм *Trichoderma* sp. 6, выделенный из почвы лесного массива г. Пущино.

Таблица 1. Синтез внеклеточной L-лизин- $\alpha$ -оксидазы при твердофазном культивировании грибов на пшеничных отрубях. Влияние различных источников азота.

Штамм	Активность ЛО*, Е/г субстрата					
	Без	$\text{NaNO}_3$	$\text{KNO}_3$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$
<i>T. aureoviride</i> ВКМ F- 2026	2	15	10	10	10	20
<i>T. viride</i> ВКМ F-2721	2	20	10	15	10	20
<i>T. virens</i> ВКМ F-1117	1	10	10	5	5	15
<i>Trichoderma</i> sp. 6	5	30	20	20	15	60

\*Указана максимальная активность (на 12-14 сутки ферментации).

#### Литература:

1. Березов Т.Т. (2005) Молекулярные и биохимические основы энзимотерапии опухолей – Биомедицинская химия, 51, 3, 235-247.
2. Kitani Y., Tsukamoto C., Zhang G., Nagai H., Ishida M., Ishizaki S., Shimakura K., Shiomi K., Nagashima Y. (2007) Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli* – FEBS J., 274, 1, 125-136.
3. Calderon J., Olvera I., Martinez L.M., Davila G.A. (1997) *Neurospora crassa* mutant altered in the regulation of L-amino acid oxidase – Microbiolology, 143, 1969-1974.
4. Папоян А.Р., Оганесян С.П., Давтян М.А. (2001) Активность оксидазы L-аминокислот у гриба *Aspergillus niger* R-3 в зависимости от источника азота в среде – Прикл. биохим. микробиол., 37, 3, 297-300.
5. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Misono H., Soda K. (1980) A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties – J. Biol. Chem., 255, 3, 976-981.
6. Смирнова Н.П., Хадуев С.Х. (1986) L-лизиноксидазная активность некоторых видов *Trichoderma* – Микробиология, 53, 1, 163-164.

## **Анализ генома диплоидных и гаплоидных форм кукурузы на наличие маркерных генов после агробактериальной трансформации генеративных клеток кукурузы**

Мамонтова Е.М.<sup>1</sup>, Великов В.А.<sup>1,2</sup>, Волохина И.В.<sup>1</sup>, Чумаков М.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, РФ, 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д.13*

<sup>2</sup> *Саратовский государственный университет, РФ, Саратов*  
*e-mail: [mamontovaem@mail.ru](mailto:mamontovaem@mail.ru)*

Проблема обеспечения растущих глобальных потребностей в пище, топливе и материалах диктует необходимость повышения продуктивности растений, создания новых веществ и препаратов для сельского хозяйства, медицины и промышленности. Одним из хорошо зарекомендовавших себя на практике биотехнологических направлений повышения продуктивности растений является технология создания трансгенных растений с желательными хозяйственно-полезными свойствами путем доставки функциональных генов в составе Т-ДНК агробактерий. В настоящее время существует значительное количество методов трансформации растений, которые в основном предназначены для трансформации вегетативных тканей растений (Chumakov, 2007). Традиционные методы требуют трудоемких этапов получения эмбрионного каллуса, отбора и регенерации трансформированных растений и дают низкую частоту трансгенных растений, приводят к химерности у трансформантов. Кроме того, методы генетической трансформации, основанные на использовании культуры тканей у злаков применимы только для определенных генотипов, обладающих хорошей регенерационной способностью.

Целью работы является создание эффективной технологии получения трансгенных растений кукурузы путем агробактериальной трансформации генеративных клеток. Метод позволяет избежать стадии регенерации тканей и химерности растений.

### **Материалы и методы**

Трансформацию осуществляли путем нанесения суспензии клеток *Agrobacterium tumefaciens* с активированными *vir*-генами на пестичные нити кукурузы, с последующим опылением<sup>1</sup>. Встройку Т-ДНК в геном кукурузы выявляли методом ПЦР (гены *nptII* и *gus*). Для анализа использовали диплоидные двухнедельные проростки и взрослые гаплоидные растения, выращенные из семян подвергшихся трансгенезу растений. Наличие маркерного гена у гаплоидов, развившихся из яйцеклетки без оплодотворения доказывает встраивание Т-ДНК в геном яйцеклетки.

Контаминация агробактериями проверена с помощью ПЦР анализа на специфические для агробактерий гены *virA*, *virC1* и *virC2*. ПЦР анализ показал отсутствие генетического материала бактерий в растворе ДНК растения.

### **Результаты и обсуждение**

ПЦР анализу были подвергнуты 104 диплоидных проростка из которых 96 растений – зеленые канамицин-устойчивые, и 8 – белые, не устойчивые к канамицину. Из общего числа проростков 92 несли ген *nptII* (88,5%). Из 8 белых

проростков 4 имеют в составе ДНК nptII, что говорит об отсутствии экспрессии маркерного гена в данном случае.

Анализ взрослых гаплоидных растений первого поколения показал присутствие гена nptII в 7 из 20 исследованных растений (35%). Из этого следует, что Т-ДНК может (пока неизвестным для нас способом) попадать с прорастающей пыльцевой трубкой в клетки женского гаметофита.

Таблица 1. Анализ частоты встройки Т-ДНК в геном кукурузы после обработки пестичных нитей кукурузы

Параметры	Количество, шт.
<b>2007 г.</b>	
Выборка семян	90
Количество зеленых проростков, выросших на среде с канамицином	58
Количество проростков, проанализированных методом ПЦР	58
Количество ПЦР-положительных проростков (% к общему числу канамицин-положительных проростков)	56 (96%)
<b>2008 г.</b>	
Выборка семян	88
Количество выращенных проростков (зеленых и белых)	46
Количество зеленых проростков, выросших на среде с канамицином	38
Количество проростков, проанализированных методом ПЦР	46*
Количество ПЦР-положительных проростков (% к общему числу проростков)	36 (78%)

\* 10 из 46 проростков проанализированы на gus, а 36 – на nptII

#### Литература:

1. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., И.В. Волохина (2006) – Генетика, 42, 8, 1083-1088.
2. Chumakov M.I. (2007) Agrobacterium-Mediated Plant Transformation under in planta conditions – Transgenic Plant Journal, 1 (1), 60-65.

## Л-аланоил-D-глутаматпептидаза бактериофага T5 как потенциальное антибактериальное средство

Микулинская Г.В.<sup>1</sup>, Одиноква И.В.<sup>2</sup>, Лысанская В.Я.<sup>3</sup>, Зимин А.А.<sup>3</sup>, Феофанов С.А.<sup>1</sup>, Степная О.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Россия, Московская область, г.Пушино, пр.Науки, д.6.

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, Московская область, г.Пушино, ул.Институтская, д.3

<sup>3</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, Россия, Московская область, г.Пушино, пр.Науки, д.5.  
e-mail: [mikulinskaya@fibkh.serpukhov.su](mailto:mikulinskaya@fibkh.serpukhov.su)

Эндолизины бактериофагов являются компонентами бинарной системы лизиса клетки-хозяина, свойственной бактериофагам порядка *Caudovirales*. Эта система состоит из эндолизина, разрушающего пептидогликан клеточной стенки бактерий, и гидрофобного белка холина, образующего поры во внутренней мембране клетки. По типу связей, гидролизующихся в пептидогликане, эндолизины делят на 5 классов: мурамидазы, литические трансгликозилазы, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, N-ацетилмурамил-L-аланинамидазы и пептидазы (Borysowski et al., 2006, Loessner, 2005). Эндолизины широко применяются в биотехнологии, медицине, сельском хозяйстве как антибактериальные средства различного спектра действия.

В процессе секвенирования и анализа фрагмента ранней области *C* генома бактериофага T5 нами были обнаружены гены вероятных холина и эндолизина, находящиеся под общим промотором. Эндолизин предстал полипептидом длиной 137 аминокислот с ожидаемой молекулярной массой 15,266 кДа и расчетным значением pK 8,32. Предполагаемая функция продукта гена *lys* была подтверждена экспериментально посредством клонирования гена в *E.coli* в плазмиду pET3a по сайтам *NdeI* – *BamHI*. Индукция синтеза белка, осуществленная в клетках *E.coli* BL21(DE3), завершилась синтезом продукта ожидаемого размера.

Эндолизин бактериофага T5 был очищен из клеток штамма-производителя до электрофоретически гомогенного состояния посредством последовательных хроматографий на Toyopearl 650M и фосфоцеллюлозе (рис.1 и табл.1).

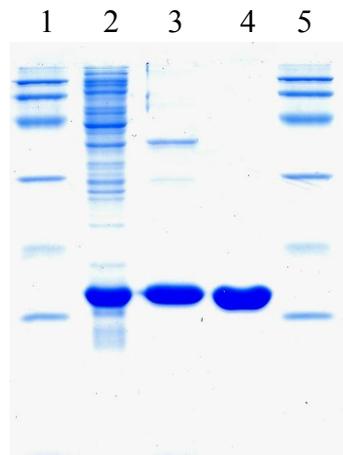


Рис. 1. Очистка эндолизина бактериофага T5

1, 5 – маркеры молекулярной массы, 2 - грубый экстракт,  
3 – хроматография на Toyopearl 650M, 4 – хроматография на фосфоцеллюлозе.

Таблица 1. Очистка эндолизина бактериофага T5

	Общий белок, мг	Активность удельная	Активность общая	Степень очистки	Выход, %
Грубый экстракт	60	1 830	109 800	1	100
Хроматография на Toyopearl 650M	26,4	4 000	105 600	2,2	96
Хроматография на фосфоцеллюлозе	10,2	8 380	85 480	4,6	78

Активность измеряли турбидиметрически по убыванию оптической плотности при 450 нм обработанных хлороформом клеток *E. coli* в 1-см акриловых кюветах. 1 единица активности обеспечивает уменьшение оптической плотности на 0,001 единицы в минуту.

Было показано, что оптимальными для работы фермента являются слабощелочные (pH=8,5) цвиттерсионные буферы с низкой ионной силой (25-50 мМ), содержащие мягкий неионный детергент. Фермент является кальций-зависимым: комплексообразователи ингибируют его активность, и лишь добавление катионов кальция частично восстанавливает её.

Анализ гидролизата пептидогликана *E. coli* эндолизином бактериофага T5 методом Гюйзена (Ghuysen et al, 1966) показал, что исследуемый фермент - L-аланоил-D-глутаматпептидаза. Учитывая зависимость фермента от кальция, мы можем отнести L-аланоил-D-глутаматпептидазу бактериофага T5 к субклассу металлоэндопептидаз (EC 3.4.24.\*).

Эндолизины характеризуются определенным спектром антибактериального действия. Он может быть широким или узким, что обуславливает их применение. Так, эндолизин умеренного фага φ0303 *Lactobacillus helveticus* (Deutsch et al, 2004), а эндолизин бактериофага φ3626 специфически разрушает клеточные стенки только бактерии *Clostridium perfringens* (Zimmer M. et al., 2002).

Для оценки спектра бактериолитического действия эндолизина бактериофага T5 был взят ряд бактерий с различной структурой пептидогликана. Есть основания предполагать, что эндопептидаза бактериофага T5 специфична к клеточным стенкам Грам-отрицательных микроорганизмов. Среди них есть и патогенные виды, что делает эндопептидазу T5 потенциальным кандидатом для применения в биотехнологии и растениеводстве в качестве антибактериального средства направленного действия.

#### Литература:

1. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. (2006) Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. – Exp Biol Med (Maywood), 231, 4, 366-377.
2. Ghuysen J.M., Tipper D.J., Strominger J.L. (1966) Enzymes that degrade bacterial cell walls. – Methods Enzymol, VIII, 685-711.
3. Deutsch S.M., Guezenec S., Piot M., Foster S., Lortal S. (2004) Mur-LH, the broad-spectrum endolysin of *Lactobacillus helveticus* temperate bacteriophage phi-0303. – Appl Environ Microbiol, 70, 1, 96-103.
4. Loessner M.J. (2005) Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. – Curr Opin Microbiol., 8, 4, 480-487.
5. Zimmer M., Vukov N., Scherer S., Loessner M.J. (2002) The murein hydrolase of the bacteriophage phi3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. – Appl Environ Microbiol., 68, 11, 5311-5317.

## Генетическая классификация гликозил-гидролаз семейства GH31

Наумов Д.Г.

*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Россия, Москва 117545, Первый Дорожный проезд, дом 1, e-mail: [daniil\\_naumoff@yahoo.com](mailto:daniil_naumoff@yahoo.com)*

Гликозил-гидролазы (или гликозидазы) [К.Ф. 3.2.1] – обширная группа ферментов, ответственных за расщепление углеводов. Они представлены почти во всех живых организмах: в среднем около 1% генов в каждом геноме кодирует гликозидазы и их гомологи. В рамках классификации CAZy [1] на основании сравнения аминокислотных последовательностей каталитические домены всех известных гликозидаз объединены в семейства (GH1-GH112). В ряде случаев эволюционно родственные семейства на более высоком иерархическом уровне сгруппированы в кланы: 14 кланов (GH-A – GH-N) содержат 48 семейств. Для одного из семейств (GH13) предложено разбиение на подсемейства.

Разработка иерархических классификаций различных групп белков является важнейшей предпосылкой для качественной аннотации генов в рамках геномных проектов. Различные характеристики белков (тип трёхмерной структуры, молекулярный механизм катализируемой реакции, субстратная специфичность, строение активного центра и т.д.) имеют различный уровень консервативности и поэтому использование иерархических классификаций позволяет более точно предсказывать свойства экспериментально не охарактеризованных белков.

Известны многочисленные данные [2], указывающие на родство гликозидаз из разных кланов, а также из семейств, не включённых в состав кланов, однако эти факты игнорируются в классификации CAZy [1]. Использование этих данных позволяет приступить к созданию иерархической классификации гликозидаз. При этом возникает потребность в выработке достаточно универсальных критериев выделения каждого из её уровней, а также автоматизации поиска гомологов и их разбиения на (под)семейства. В настоящей работе мы предприняли попытку решения этих задач на примере белков семейства GH31 гликозил-гидролаз.

Согласно базе данных CAZy [1], семейство GH31 объединяет более 500 белков из бактерий, архей и эукариот. Среди них представлены ферменты с семью типами энзиматических активностей. Вместе с семействами GH27 и GH36 гликозил-гидролаз оно образует клан GH-D. Итеративный скрининг базы данных аминокислотных последовательностей с помощью программы PSI-BLAST позволяет находить большое число белков, содержащих гомологичные домены.

Нами была разработана программа PSI Protein Classifier, позволяющая обобщать результаты, полученные как при независимых, так и при последовательных итерациях PSI-BLAST. В частности, программа PSI Protein Classifier способна объединять найденные белки на основе уровня сходства (значения *E-value*), а также определять их принадлежность ранее известным иерархическим группам, например семействам, на основе имеющихся списков. Такие списки семейств составлялись на основе баз данных CAZy [1] и COG [3], с дальнейшим их пополнением близкими гомологами, найденными PSI-BLAST.

Экспериментальные данные о пространственной структуре каталитических доменов семейства GH31 известны для  $\alpha$ -глюкозидазы MalA из *Sulfolobus solfataricus*,  $\alpha$ -ксилозидазы YicI из *Escherichia coli* и мальтазы-глюкоамилазы MgaM

человека. Границы этих трёх GH31-доменов определялись согласно базе данных PDB [4], а остальных – на основании гомологии с ними.

Используя в качестве исходных последовательностей (query) GH31-домены мы последовательно проводили скрининг базы данных аминокислотных последовательностей с помощью программы PSI-BLAST (только первую итерацию). Список белков семейства GH31 пополняли недостающими белками из числа найденных, если они имели *E-value* меньше, чем  $10^{-7}$ . По итогам каждого скрининга белки, имевшие *E-value* меньше, чем  $10^{-50}$ , объединяли с соответствующим белком-query в одну группу. Белки, уже отнесённые к какой-либо группе, для скрининга базы данных не использовали. Всего было выделено 52 группы белков в семействе GH31. Многие белки оказались принадлежащими более чем одной группе, так как они находились при скрининге с *E-value* меньшим  $10^{-50}$  с двумя или более белками-query. В процессе 52 скринингов с помощью программы PSI-BLAST в общей сложности было обнаружено 1094 различных белка, 1035 из которых принадлежало семейству GH31, а остальные 59 – семейству GH36. Применение программы PSI Protein Classifier позволило объединить 52 группы белков из семейства GH31 в 30 подсемейств, используя принцип транзитивности (наличие в каких-то двух группах хотя бы одного общего белка служило основанием для объединения этих двух групп в одно подсемейство). При этом крупнейшее подсемейство I объединяет 15 групп белков, подсемейство II – четыре группы, подсемейство III – три, ещё три подсемейства (IV, V и VI) – по две группы, а оставшиеся 24 подсемейства (VII-XXX) содержат по одной группе белков.

Для поиска отдалённых гомологов GH31-доменов в качестве исходных последовательностей (query) при скрининге базы данных аминокислотных последовательностей с помощью программы PSI-BLAST использовали домены MalA и YicI. Всего было проведено 11 итераций. В результате в общей сложности было обнаружено 4492 белка с *E-value* меньшим, чем 0.005. Найденные белки в областях, проявляющих сходство с доменами семейства GH31, содержат каталитические домены семейств GH13 (2826 белков), GH27 (280), GH31 (983), GH36 (375) и GH101 (11) гликозил-гидролаз, а также домены COG1306 (1 белок), COG1649 (15) и COG3868 (1) энзиматически неохарактеризованных белков. Полученные данные свидетельствуют о родстве всех указанных семейств, что позволяет их объединить на более высоком иерархическом уровне.

Использованные нами пороговые значения *E-value*  $10^{-50}$ ,  $10^{-7}$  и 0.005 могут быть рекомендованы для выделения иерархических уровней в классификации после их дополнительного тестирования на других группах ферментов.

Работа получила финансовую поддержку РФФИ (грант 06-04-49079-а).

### Литература:

1. CAZy – Carbohydrate-Active Enzymes server. 2008. (<http://www.cazy.org>).
2. Naumoff D.G. (2006) Development of a hierarchical classification of the TIM-barrel type glycoside hydrolases. – Proceedings of the Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. July 16-22, 2006. Novosibirsk, Russia. 1, 294-298.
3. COGs – Clusters of orthologous groups of proteins. 2008. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)
4. PDB – Protein Data Bank. 2008. (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

## **Изменение региоспецифичности 9-липоксигеназы кукурузы при сайт-направленном мутагенезе**

Осипова Е.В., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.

*Казанский институт биохимии и биофизики, 420111 г.Казань ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 30, e-mail: [eva-0@mail.ru](mailto:eva-0@mail.ru)*

Липоксигеназы являются содержащими негемовое железо диоксигеназами, которые катализируют включение двух атомов из молекулы кислорода в ненасыщенную жирную кислоту, содержащую цис,цис-1,4-пентадиеновое основание, такие как  $\alpha$ -линоленовая и линолевая кислоты у растений и арахидоновая кислота у млекопитающих.

Существует несколько теорий относительно механизма катализа липоксигеназы, так называемая «покетная» теория [1], теория ориентации субстрата в активном центре фермента [2]. Так специфичность действия липоксигеназ определяется ориентацией субстрата в активном центре и наличием или отсутствием стерического препятствия, расположенного рядом с местом диоксигенирования. Ранее уже были проведены эксперименты, поддерживающие эту теорию на n-2 и n+2 липоксигеназах животных и n+2 липоксигеназе растений, но n-2 растительная липоксигеназа не исследовалась. В работе Коффа и Браша в качестве такого стерического препятствия выделен метильный радикал аминокислотного остатка аланина на поверхности субстрат-связывающего кармана фермента, при замене которого на глицин происходит изменение региоспецифичности и стереоспецифичности липоксигеназной реакции [3]. Эксперименты, поддерживающие эту теорию были проведены на n-2 и n+2 липоксигеназах животных и n+2 липоксигеназе растений, но n-2 растительная липоксигеназа не исследовалась.

Целью нашей работы было выявление эффекта замены Коффа Браша на специфичность реакции растительной n-2 липоксигеназы. Так нами была исследована специфичность 9-липоксигеназы кукурузы, клонированной и любезно предоставленной Ненси Келлер, а также полученных нами мутантных форм.

Согласно теории Коффа и Браша дикий тип липоксигеназы кукурузы, имеет такую аминокислотную последовательность активного центра, что определяющий специфичность аланин находится в 562 позиции, должен иметь в качестве преобладающего продукта реакции 9S-гидроперекись. При замене аланина в этой позиции на глицин должно произойти изменение региоспецифичности и стереоспецифичности реакции с образованием 13R-гидроперекиси. При этом замена аланина в 560 позиции на глицин может оказать подобный эффект лишь в случае, если и этот аминокислотный остаток является критичным для специфичности реакции.

Согласно результатам нашей работы можно сказать, что исходный рекомбинантный фермент действительно производит 98% 9-гидроперекиси, при этом наблюдается минорный продукт реакции 13-гидроперекиси, как и мутанта, имеющего замену аланина на глицин в 560 позиции. При замене аланина на глицин в 562 позиции наблюдается 68,5% 9-гидроперекиси и 31,5% 13-гидроперекиси. Во всех случаях реакция проходит высоко специфично, так как отсутствуют продукты

автоокисления субстрата. Были определены также стерические конфигурации продуктов реакции. Оказалось, что исходный фермент, как и мутантный фермент с заменой Ala560Gly производит 9*S*-гидроперекись в количестве 97,5% от всех продуктов реакции, а в качестве минорных продуктов выступают 9*R*, 13*S* и 13*R* гидроперекиси, общее количество которых не превышает 2,5%. Мутантный фермент с заменой Ala562Gly образует 9*S*-гидроперекись в количестве 66%, и 13*R*-гидроперекись в количестве 30% от общих продуктов, а также минорные продукты 9*R* и 13*S* гидроперекиси в количестве не превышающим 3,4% от всех продуктов.

Согласно созданной пространственной модели трехмерной структуры липоксигеназы кукурузы, построенной на основе гомологии первичной последовательности аминокислот с последовательностью липоксигеназы сои, боковая цепь аминокислотного остатка Ala560 находится во внутренней части активного центра. Боковая цепь аминокислотного остатка Ala562, напротив, находится на поверхности активного центра, причем в непосредственной близости от атома железа и, по-видимому, принимает участие в формировании региоспецифичности фермента.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что при замене Ala560Gly в мутантном ферменте не изменяет регио- и стереоспецифичность реакции, так как, эта замена не является определяющей для специфичности реакции. При замене в липоксигеназе кукурузы Ala562Gly изменяется региоспецифичность реакции, так как удаляется стерическое препятствие в виде метильного радикала аминокислотного остатка, определяющее специфичность реакции. Полученные данные свидетельствуют о частичном смещении региоспецифичности фермента, тогда как стереоспецифичность не изменяется. Ранее Коффа и Браш предположили, что метильный радикал аланина может быть стерическим препятствием, затрудняющим доступ кислорода к определённой позиции. С нашей точки зрения, более убедительным может быть другое объяснение: замена аланина на глицин или наоборот может вызывать изменение позиции субстрата по отношению к железу и, тем самым – к изменению региоспецифичности фермента.

#### **Литература:**

1. *Gillmor S.A., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. F.* (1998) The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity – *Nature Structure of Biology*, 4, 1003-1009.
2. *Garner H. W.* (1989) Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both 9(*S*)-and 13(*S*)-hydroperoxides from linoleic acid by pH-dependent mechanism – *Biochimic Biophysic Acta.*, 1001, 274-281.
3. *Coffa G., Brash A.R.* (2004) A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15579–15584.

## Биосенсорные системы на основе бактерий-деструкторов капролактама

Россинская И.В.

Тульский государственный университет, 300600 Тула, пр. Ленина 92,

e-mail: [chem@tsu.tula.ru](mailto:chem@tsu.tula.ru)

Биосенсорные системы вследствие их экспрессности, возможности работы on-line, умеренной стоимости являются хорошей альтернативой существующим методам анализа водных сред. В области экологического мониторинга наиболее широко используют биосенсоры на основе целых клеток микроорганизмов. Кроме того, такие биосенсоры могут быть использованы не только для аналитических целей, но и для изучения влияния различных факторов на бактериальные клетки.

Выбор бактерий-деструкторов капролактама (широко используемого химического продукта) в качестве объекта исследования продиктован актуальностью разработки методов анализа и биологической очистки сточных вод, содержащих данный ксенобиотик.

**Цель работы:** выявление закономерностей биodeградации капролактама и его олигомеров бактериальными штаммами с помощью биосенсорного подхода.

Способность к окислению капролактама у большинства штаммов бактерий рода *Pseudomonas* определяется наличием в бактериальной клетке плазмид биodeградации, которые отвечают за синтез ферментной системы, осуществляющей деградацию данного субстрата. Такие плазмиды определяют деградацию капролактама по одной и той же схеме, однако на этот процесс влияет как плаزمид, так и бактериальный хозяин. Для исследования влияния сочетаний «бактериальный хозяин - CAP-плазмиды» на регуляцию процесса утилизации капролактама в работе использовали: штамм *Pseudomonas putida* BS394, содержащий различные плазмиды биodeградации  $\epsilon$ -капролактама (pBS268, pBS265, pBS276), штаммы *Pseudomonas fluorescens* 38a и *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391, содержащие одну и ту же CAP-плазмиду - pBS268. Были получены удельные активности ферментных систем деградации капролактама, которые рассчитывали по убыли субстрата при инкубации бактерий в растворе, содержащем капролактама (таблица 1).

Таблица 1. Параметры градуировочных зависимостей биосенсоров и удельные активности ферментных систем

Штамм	Эффективная константа Михаэлиса, мМ	Коэффициент чувствительности, нА/(с*мМ)	Удельная активность ферментных систем, мкМ/(мг*мин)
<i>P. putida</i> BS394(pBS268)	0,12±0,06	0,08±0,01	0,17±0,02
<i>P. putida</i> BS394(pBS265)	0,14±0,03	0,11±0,01	0,16±0,02
<i>P. putida</i> BS394(pBS276)	0,14±0,05	0,020±0,006	0,11±0,03
<i>P. fluorescens</i> 38a(pBS268)	0,6±0,1	0,002±0,002	0,09±0,02
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391(pBS268)	0,71±0,06	0,003±0,002	0,06±0,03

Перенос плазмиды pBS268 в ризосферные штаммы *P. fluorescens* 38a и *P. chlororaphis* PCL1391 приводит к снижению активности ферментной системы деградации капролактама. Удельные активности ферментной системы катаболизма капролактама штамма *P. putida* BS394 с разными плазмидами оказались близкими по величине. Следовательно, на процесс утилизации капролактама влияет в первую очередь бактериальный хозяин.

На основе пяти исследуемых штаммов были разработаны лабораторные модели биосенсоров кюветного типа, которые позволяют проводить сравнительную оценку окислительной активности штаммов – деструкторов. Принцип работы микробного сенсора на основе кислородного электрода основан на том, что при окислении субстрата иммобилизованными на поверхности электрода микроорганизмами возрастает их дыхательная активность, и в приэлектродном пространстве снижается концентрация кислорода, что регистрируется с помощью электрода. Параметры градуировочных зависимостей ответов биосенсоров от концентрации капролактама приведены в таблице 1.

Коэффициенты корреляции между параметрами градуировочных зависимостей биосенсоров и величинами удельной активности пяти выбранных штаммов составили 0,89 и 0,92.

Таким образом, впервые показана возможность применения биосенсорного подхода для быстрого скрининга бактериальных штаммов с различными комбинациями «бактериальный хозяин – САР-плазида». Установлено, что на процесс утилизации капролактама большее влияние оказывает выбор бактериального хозяина, чем САР-плазмиды.

Разработан макет микробного биосенсора проточно-инжекционного типа для анализа капролактама, который применили для определения содержания капролактама в образцах отходов предприятий по производству капролактама и поликапроамида. Проведенный анализ показал, что разработанный биосенсор позволяет достоверно оценивать содержание капролактама в реальных объектах.

На следующем этапе работы исследовали закономерности процесса деградации линейных олигомеров (отходов производства поликапроамида) бактериальными клетками – деструкторами капролактама с помощью биосенсорного подхода и масс-спектрометрического анализа культуральной жидкости после инкубации линейных олигомеров в присутствии штамма *P. putida* BS394(pBS268). По результатам проведенных исследований впервые выявлен путь трансформации линейных олигомеров капролактама до соответствующих дикарбоновых кислот под действием бактериальных клеток, содержащих плазмиду биodeградации капролактама. Установлено, что процесс трансформации линейных олигомеров находится под генетическим контролем плазмиды биodeградации pBS268. Показана принципиальная возможность создания биосенсора для детекции линейных олигомеров капролактама в водных средах.

## Оптимизация составов жидких питательных сред для наработки биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов

Самков А.А., Карасева Э.В.

ГОУ ВПО Кубанский государственный университет, 350040 Краснодар, Ставропольская 149, e-mail: [andreysamkov@mail.ru](mailto:andreysamkov@mail.ru)

Нокардиоморфные актиномицеты являются одними из наиболее активных компонентов естественных углеводородокисляющих бактериоценозов различных углеводородзагрязненных экосистем, преимущественно почв и грунтов. Использование данных микроорганизмов в качестве биологического агента биоремедиации требует синтеза в лабораторных и промышленных условиях большого количества клеточной биомассы, расходуемой в ходе биообработок.

Целью эксперимента являлось увеличение продукции биомассы нефтеокисляющих нокардиоморфных актиномицетов при глубинном культивировании на жидкой минеральной среде с углеводородом в качестве источника углерода и энергии.

Исследовали влияние концентрации важнейших биогенных элементов – С, N и P посредством выращивания на средах с различными их соотношениями. В качестве растворителя солей использовали дистиллированную, либо морскую воду. В качестве единственного источника углерода и энергии - гексадекан. Состав сред был определен планом полного факторного эксперимента (ПФЭ) 2<sup>3</sup>. В полном факторном эксперименте, а также эксперименте по крутому восхождению использовали штамм *Rhodococcus erythropolis F1*.

На заданном уровне варьирования факторов, оптимальное соотношение биогенных элементов было разным для дистиллированной и морской воды. Увеличение выхода биомассы, выращиваемой на дистиллированной воде, требовало повышенных концентраций углерода с азотом и не зависело от содержания фосфора в среде.

Уравнение регрессии в данном случае имело вид (1):

$$y=1,81+0,9975x_1+0,5375x_2 \quad (1)$$

(где y – выход биомассы) и было использовано для оптимизации состава питательной среды методом крутого восхождения.

При использовании в качестве основы среды натуральной морской воды, уравнение регрессии имело вид (2):

$$y=1,1189+0,194x_1-0,369x_2-0,169x_1x_2+0,394x_3 \quad (2)$$

Как видно из уравнения (2), увеличение концентрации углеводорода – источника углерода и энергии положительно сказалось на выходе биомассы клеток, аналогично опытам с пресной водой. Однако, ПФЭ со средами на морской воде показал положительное влияние увеличения концентрации фосфатов и отрицательное – нитрата калия. На основании коэффициентов регрессии и величин λ из ПФЭ 2<sup>3</sup>, был определен состав сред опытов по крутому восхождению, различный для пресной и морской воды. Были определены составы питательных сред, обеспечивающих максимальный выход биомассы штамма *Rhodococcus erythropolis F1*.

Была проверена возможность применения сред оптимизированного состава для получения биомассы клеток более широкого круга видов и родов нефтеокисляющих нокардиоморфных актиномицетов. Для этого, сравнили продукцию биомассы на полученных средах, приготовленные на основе пресной (рис.1) и морской (рис. 2) воды и на среде исходного состава. В качестве источника углерода использовали гексадекан либо дизельное топливо. Все исследованные штаммы показали в разной степени выраженное увеличение выхода биомассы при использовании оптимизированных сред. Аналогично штамму *Rhodococcus erythropolis F1*, рост

клеточной массы при использовании среды на пресной воде был выше такового на морской. Гексадекан являлся более эффективным питательным субстратом, чем дизельное топливо, что могло быть связано с отсутствием в первом токсичных для клеток углеводородных соединений. Концентрация биомассы в контроле (минеральная среда неоптимизированного состава с гексадеканом) варьировала незначительно, тогда как большие различия концентраций на оптимизированных средах показывают штаммоспецифичность отклика бактериальных культур на изменение абсолютного содержания, а также соотношения основных биогенных элементов. Средняя по пяти исследованным штаммам концентрация биомассы для оптимизированной среды на основе пресной воды составила 7,1 г/л при использовании гексадекана и 4,8 г/л при использовании дизельного топлива. Для сред на основе морской воды цифры составили 4,5 и 3,5 г/л соответственно.

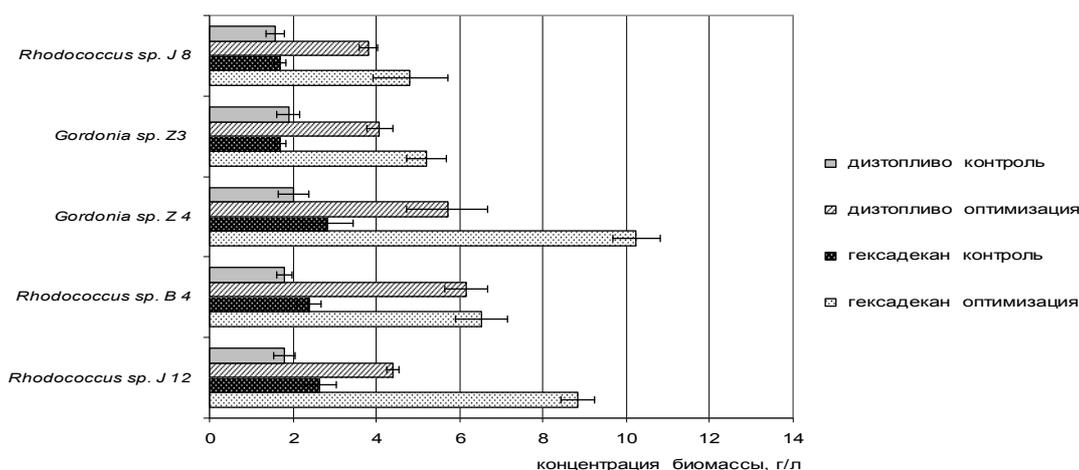


Рис. 1. Продукция биомассы нефтеокисляющими микроорганизмами при росте на минеральной среде оптимизированного состава

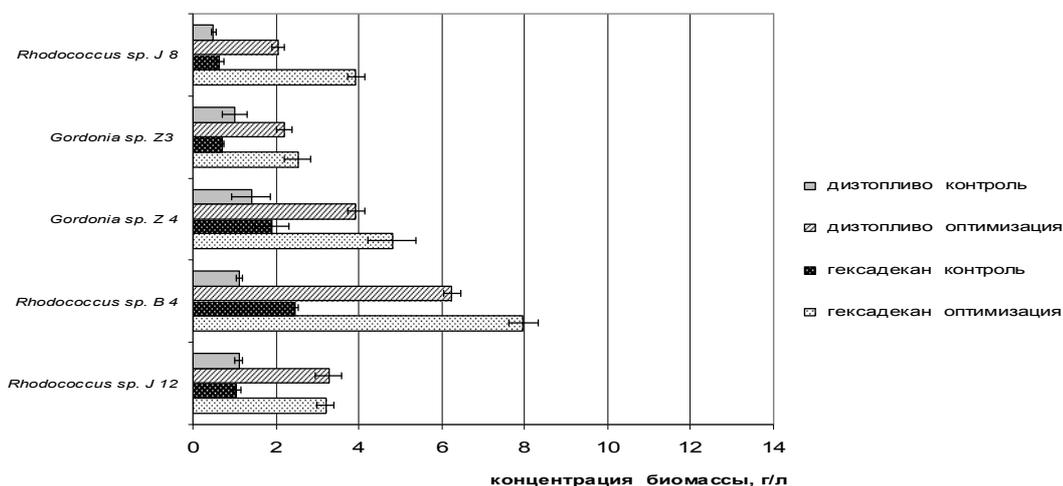


Рис. 2. Продукция биомассы нефтеокисляющими микроорганизмами при росте на минеральной среде оптимизированного состава на основе морской воды

Высокая продукция биомассы разными штаммами на средах оптимизированного состава при использовании дизельного топлива (дешевого углеводородного субстрата) говорит о возможности полупромышленного масштабирования получения клеток нефтеокисляющих нокардиоморфных актиномицетов для целей биостимуляции *in vitro* или биоаугментации.

## **Состав углеводородокисляющих микробных сообществ воды и донных отложений Азовского моря и Приазовских лиманов в районе предполагаемых нефтеразработок**

Самкова С.М., Гора В.В.

*ГОУ ВПО Кубанский Государственный Университет, 350040 Краснодар, Ставропольская 149, e-mail: [andreysamkov@mail.ru](mailto:andreysamkov@mail.ru)*

Одним из важнейших секторов современной экономики является добыча и переработка углеводородного сырья. Однако его запасы на суше во многих районах близки к истощению и экономически не рентабельны, и все больший упор делается на поиск и добычу углеводородов на морском шельфе. В то же время, добыча нефти в морских акваториях и транспортировка ее морем связаны с серьезными проблемами сохранности окружающей среды. Так как бактерии в значительной мере определяют способность морских экосистем к самоочищению, а их качественный и количественный состав может быть использован для прогнозирования реакции гидробионтов на техногенные изменения, изучение микробиологического разнообразия водных сообществ остается весьма актуальным.

В работе приведены данные по численности, таксономическому разнообразию и деструкционной активности микрофлоры воды и донных отложений Азовского моря и Приазовских лиманов в районе предполагаемых нефтеразработок. Учет численности и выделение штаммов микроорганизмов вели на агаризованных средах с низким содержанием углерода и на питательном агаре. Идентификацию проводили на основе культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств. Нефтеокисляющую активность проверяли на минеральной жидкой среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии. Количество выявляемых на питательном агаре гетеротрофных бактерий колебалось от  $10^2$  до  $10^4$  клеток/мл в зависимости от точки отбора проб. Олиготрофные микроорганизмы присутствовали во всех пробах воды Азовского моря и лиманов. Средняя численность бактерий этой группы была максимальной как в пробах воды, так и в образцах донных отложений, как минимум в несколько раз превышая численность сапрофитной группы. Нефтеокисляющие бактерии присутствовали в большинстве исследуемых проб воды, количество их варьировало от единичных клеток до  $10^4$  клеток на мл. В пробах донных отложений концентрация нефтеокисляющих микроорганизмов составляла  $10^2$  клеток/г. В результате работы выделено 86 штаммов, предварительно идентифицированных до родового ранга. Большинство изолятов Азовского моря отнесены к гамма-подклассу протеобактерий (рис. 1).

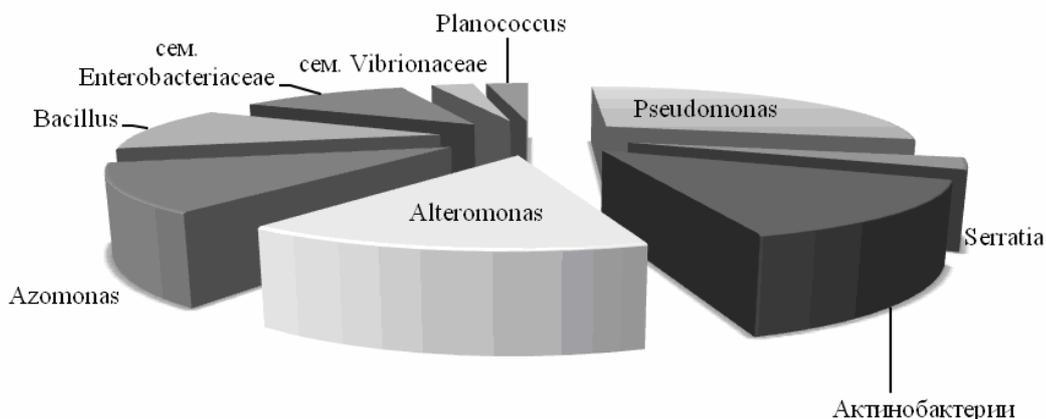


Рис. 1. Микробное разнообразие в пробах воды акватории Азовского моря

Доминировали грамотрицательные аэробные палочки с дыхательным типом метаболизма родов *Pseudomonas* (28,6%), *Alteromonas* (14,3%), *Azomonas* (11,4%). В меньших количествах встречались грамотрицательные факультативно аэробные палочки с бродильным типом метаболизма, отнесенные к семействам *Enterobacteriaceae* (11,4%) и *Vibrionaceae* (2,9%). Грамположительный компонент бактериального сообщества менее разнообразен. Эта таксономическая группа представлена родами *Bacillus* (11,4%), *Planococcus* (2,9%) и не идентифицированными представителями нокардиоформных актиномицетов (13,5%). В пробах воды Приазовских лиманов в значительном количестве помимо представителей гамма-подкласса протеобактерий (50%) выделялись представители филума актинобактерий (40%) (рис. 2).

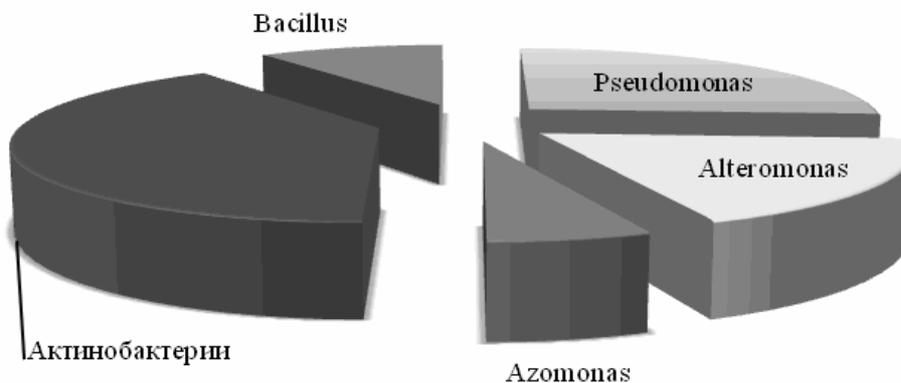


Рис. 2. Микробное разнообразие в пробах воды Приазовских лиманов

Грамположительный компонент с низким содержанием Г+Ц в ДНК характеризуется меньшим количеством изолятов. Исследована углеводородокисляющая активность изучаемых штаммов. 77% исследованных культур из проб Азовского моря обладали способностью к деструкции сырой нефти. Среди изолятов Приазовских лиманов деструкционную активность проявили 80% штаммов, однако индивидуальная активность изолятов была выше. Ведется работа по изучению спектров потребления индивидуальных углеводов и созданию консорциумов - активных деструкторов нефти и нефтепродуктов.

Работа выполнялась в рамках проекта № 06-04-96811, при финансовой поддержке РФФИ.

## Использование схемы двухлокусного типирования для идентификации штаммов бифидобактерий, изолированных у детей раннего возраста

Субботина М.Е.<sup>1</sup>, Кунда М.С.<sup>2</sup>, Воронина О.Л.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: [voronina@iab.ac.ru](mailto:voronina@iab.ac.ru)

<sup>2</sup> НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>3</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский пр., 33

**Введение.** Бифидобактерии – основа микрофлоры детей раннего возраста. Для детей, находящихся на грудном вскармливании, они составляют 60-91% кишечной микрофлоры, а у детей на смешанном питании – 28 – 75% (в среднем 50%). Как показали исследования начала 2000-х гг., важен видовой состав бифидофлоры для гармоничного функционирования всех систем организма. Преваляирование в бифидофлоре детей раннего возраста *Bifidobacterium adolescentis* приводит к развитию аллергии в 6 случаях из 7. Поэтому актуален анализ видовой принадлежности бифидобактерий, первично заселяющих кишечник новорожденных.

Ранее мы разработали схему двухлокусного типирования бифидобактерий на основе секвенирования фрагментов генов 16S rRNA и трансацетилазы (tal), проанализировав 21 штамм из Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

В задачу данного исследования входило использование отработанной методики для видовой идентификации штаммов, изолированных у детей раннего возраста, получавших грудное или смешанное питание.

**Материалы и методы.** Материалами исследования послужили штаммы бактерий рода *Bifidobacterium* из Государственной коллекции нормальной микрофлоры МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, изолированные у детей возраста 1-18 месяцев.

ДНК выделяли методом сорбции на силикагеле с помощью набора «DNA Extra-Sorb» (лаборатория молекулярной диагностики и гено-инженерных конструкций ВНИИСБ РАСХН). Фрагменты генов 16S rRNA и tal амплифицировали в ПЦР, очищали и концентрировали по разработанной нами методике и секвенировали на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems / Hitachi). Анализ последовательностей и выравнивание выполняли с помощью программы CLUSTAL W (1.83).

**Результаты и обсуждение.** Результаты видовой идентификации штаммов бифидобактерий представлены в таблице 1.

Как видно из данных таблицы, среди штаммов, идентифицированных в кишечнике детей, чаще всего встречаются виды *B. bifidum* (27%), а также *B. pseudocatenulatum* (23%), реже - виды *B. adolescentis* (18%) и *B. breve* (9%). Штаммы *B. longum* и *B. angulatum* найдены лишь в единичных случаях.

Следует отметить, что исследователи Великобритании и Новой Зеландии у детей раннего возраста в своих странах чаще обнаруживали *B. longum* (55% и 47%), затем *B. bifidum* (21% и 24%) и *B. adolescentis* (3% и 18%) или *B. pseudocatenulatum* (14% и 12%).

Штамм *B. infantis*, характерный для кишечной микрофлоры новорожденных в 60-80-е гг., в последние десятилетия не детектируется как у детей в нашей стране, так и в других развитых странах, тогда как в Гане у 72% обследованных

новорожденных детей высевались бифидобактерии этого вида. Отмеченный факт подчеркивает влияние экологии на формирование видового состава бифидофлоры кишечника новорожденных.

Из данных таблицы 1 следует также, что среди идентифицированных нами штаммов присутствуют рекомбинантные, т.е. по результатам секвенирования фрагментов генов 16S rRNA и tal эти штаммы относятся к разным видам. Рекомбинантные штаммы найдены только у детей, чью бифидофлору стимулировали пробиотиками на основе бифидобактерий.

Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная схема двухлокусного типирования может быть применена и к вновь изолированным штаммам. Результаты идентификации бифидобактерий подчеркивают важность экологии окружающей среды и питания для формирования оптимального видового состава бактерий этого рода у новорожденных. Обнаружение рекомбинантных штаммов бифидобактерий у детей, принимавших пробиотики, требует дальнейшего внимательного анализа влияния выявленных штаммов на деятельность иммунной и других систем развивающегося организма новорожденных.

Таблица 1. Результаты видовой идентификации штаммов бифидобактерий из кишечника детей раннего возраста

Штамм	Результат идентификации штаммов на основе секвенирования фрагментов генов		Тип питания детей
	16S rRNA	tal	
OV2	<i>B. pseudocatenulatum</i> (EU272010)	<i>B. pseudocatenulatum</i> (EU272016)	грудное
OV3	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	смешанное
OV5	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i>	грудное
OV7	<i>B. bifidum</i> (EU272011)	<i>B. bifidum</i> (EU272017)	грудное
OV8	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	грудное
OV9	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	грудное
OV10	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	смешанное
OV12	<i>B. breve</i> (EU272015)	<i>B. breve</i> (EU272021)	смешанное
OV14	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>	смешанное
OV15	<i>B. angulatum</i> (EU272012)	<i>B. angulatum</i> (EU272020)	грудное
OV16	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i>	смешанное
OV17	<i>B. pseudocatenulatum</i> (EU334365)	<i>B. pseudocatenulatum</i> (EU334366)	грудное
OV18	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	грудное
OV19	<i>B. bifidum</i> (EU272013)	<i>B. bifidum</i> (EU272019)	грудное
OV20	<i>B. longum</i> (EU272014)	<i>B. longum</i> (EU272018)	грудное
OV21	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	грудное
OV22	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i>	грудное
OV23	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	грудное
OV24	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i>	грудное
OV1	<i>B. longum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	смешанное
OV6	<i>B. ruminantium</i>	<i>B. adolescentis</i>	смешанное
OV13	<i>B. longum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	смешанное

## Изучение антибиотикоустойчивых клонов штамма *Bacillus amyloliquefaciens*, продуцента альфа-амилазы

Токмакова И.П., Герасимова Т.В., Яненко А.С.

ФГУП «ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов»  
117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1; e-mail: [tokmakovai@yandex.ru](mailto:tokmakovai@yandex.ru)

В настоящее время амилолитические препараты широко выпускаются в нашей стране и за рубежом. Они составляют до 25 % всех производимых в мире ферментов. Амилазы находят применение почти во всех областях, где перерабатывается крахмалсодержащее сырье.

Наилучшими продуцентами альфа-амилаз в настоящее время являются штаммы грибов и бацилл. Основными направлениями работ по совершенствованию штаммов-продуцентов альфа-амилазы являются скрининг новых видов микроорганизмов, продуцирующих ферменты с уникальными свойствами из природных источников, современная селекция штаммов с использованием спонтанных и индуцированных мутантов и конструирование штаммов с использованием ДНК технологий.

Одним из подходов улучшения штаммов является метод «рибосомной инженерии», основанный на введении в штаммы мутаций, влияющих на эффективность транскрипции и трансляции. Часть мутаций, приводящих к устойчивости к различным антибиотикам - рифампицину, стрептомицину, гентамицину и др. затрагивают рибосомный комплекс (рибосомные белки, рРНК или трансляционные факторы), что приводит к увеличению продукции клеточных метаболитов: антибиотика актинофодина у *Streptomyces coelicolor* и *S.lividans* и  $\alpha$ -амилазы в штамме *Bacillus subtilis* [1, 2].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния мутаций по устойчивости к различным антибиотикам на продуктивность альфа-амилазы у штамма *Bacillus amyloliquefaciens* 65 OR 28.

Путем высева накопительной культуры штамма *Bacillus amyloliquefaciens* 65 OR 28 на среду LB с разными концентрациями антибиотиков стрептомицина и рифампицина были получены коллекции устойчивых клонов.

Из отобранных 360 рифампицинустойчивых (rifR) клонов у 11 (3 %) наблюдалось увеличение амилолитической активности, при этом у трёх клонов увеличение достигало 30-35% по сравнению с исходным штаммом.

Отбор стрептомицинустойчивых (strR) клонов производился на среде с разными концентрациями антибиотика (5, 25, 400 мкг/мл). После проверки 370 клонов было отобрано 32 клон с увеличенной амилолитической активностью. Все клоны с повышенной активностью имели низкий уровень устойчивости к стрептомицину (5 мкг/мл).

Были получены двойные мутанты, устойчивые к рифампицину и стрептомицину. В качестве исходного штамма были взяты два рифампицинустойчивых штамма с наивысшей амилолитической активностью. Анализ амилолитической активности 229 отобранных клонов, устойчивых к рифампицину и стрептомицину, показал увеличение активности на 20% только у одного клон. При выращивании отобранных клонов наблюдалось явное увеличение альфа-амилазы на поздней стационарной фазе, как у рифампицинустойчивого клон (rifR), так и у двойного клон rifR strR (рис. 1).

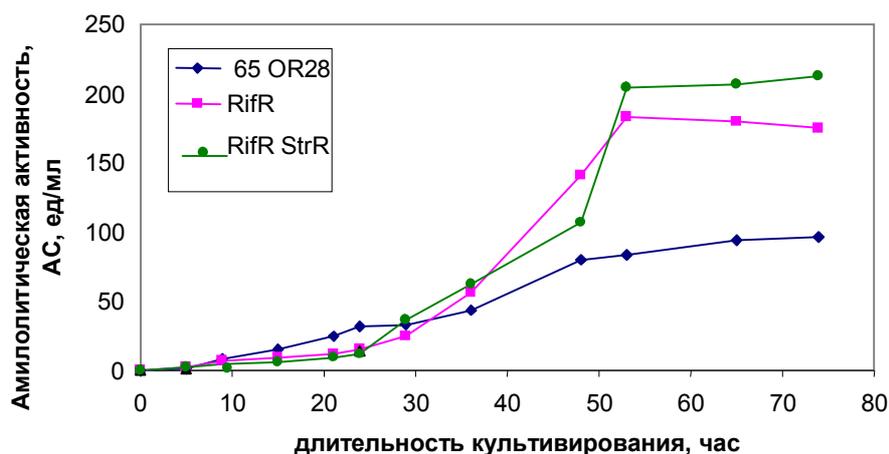


Рис. 1. Удельная амилолитическая активность штамма *Bacillus amyloliquefaciens* 65 OR28 и мутантов (RifR, RifR StrR) при ферментации в колбах на среде LB с 10 % осажаренным крахмалом при 37 °С в течении 72 часов. Активность альфа-амилазы измерялась йодно-крахмальным методом при pH 6,0 и 30 °С.

С помощью электрофореза белков в SDS-полиакриламидном геле было определено содержание альфа-амилазы в культуральной жидкости исходного и мутантных штаммов на 70 часу ферментации в лабораторных ферментерах. Наибольшее накопление альфа-амилазы, до 9-10 г/л (исходный штамм – 6,8 – 7,8 г/л), показал мутант *Bacillus amyloliquefaciens* с двойной устойчивостью к антибиотикам (рифампицин-стрептомицин).

#### Литература:

1. Nishimura K., Hosaka T., Tokuyama S., Okamoto S., Ochi K. (2007) Mutations in rsmG, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2). – J. Bacteriol., 3876-3883.
2. Nicholson W., Maughan H. (2002) The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the rpoB gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis* – J. Bacteriol., 184, 4936-4940.

## Изменение каталитических свойств LeAOS3 томата (*Lycopersicon esculentum*) в результате замены отдельных аминокислот

Топоркова Я.Ю., Гречкин А.Н.

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН,  
Казань, ул. Лобачевского 2/31, e-mail: [yanchens@yandex.ru](mailto:yanchens@yandex.ru)

В формировании системной устойчивости растений к патогенам важная роль принадлежит ферментам липоксигеназной сигнальной системы растений. Ключевыми ферментами системы являются цитохромы P450 семейства CYP74, подразделяющиеся на четыре подсемейства: CYP74A и CYP74B, специфичные к 13-гидропероксидам жирных кислот, CYP74C, отдающие предпочтение, но не абсолютно специфичные к 9-гидропероксидам, и CYP74D, включающие ферменты обоих типов. Объектом настоящего исследования стал фермент подсемейства CYP74C алленоксидсинтаза томата LeAOS3 (*Lycopersicon esculentum*).

Для определения роли отдельных аминокислот в природе катализа CYP74 значительную информацию дает метод сайт-направленного мутагенеза. Конформация и активность белков меняются при замене отдельных аминокислот в активном центре; изменение функционально незначимых участков не сказывается на свойствах фермента.

Для изменения с помощью сайт-направленного мутагенеза выбирали аминокислоты, входящие в состав консервативных доменов, таких как кислород-связывающий (уникальным свойством для CYP74 является вырожденность этого домена) домен и ERR-триада, примыкающие непосредственно к гемовому железу. Выбор проводили на основе сравнения последовательностей гомологичных ферментов, в частности P450, для которых есть данные рентгеноструктурного анализа.

Были проведены следующие замены: D359R, F300I и S302A в LeAOS3. Замены фенилаланина и серина в кислород-связывающем домене LeAOS3 на изолейцин и аланин, соответственно привели к изменениям в катализе. Мутантные формы сохранили способность утилизировать 9-гидроперекись линолевой кислоты. Однако, наряду с продуктами, характерными для реакции LeAOS3, появились продукты, характерные для гидропероксидлиаз, а именно 9-оксононановая кислота (Рис. 1).

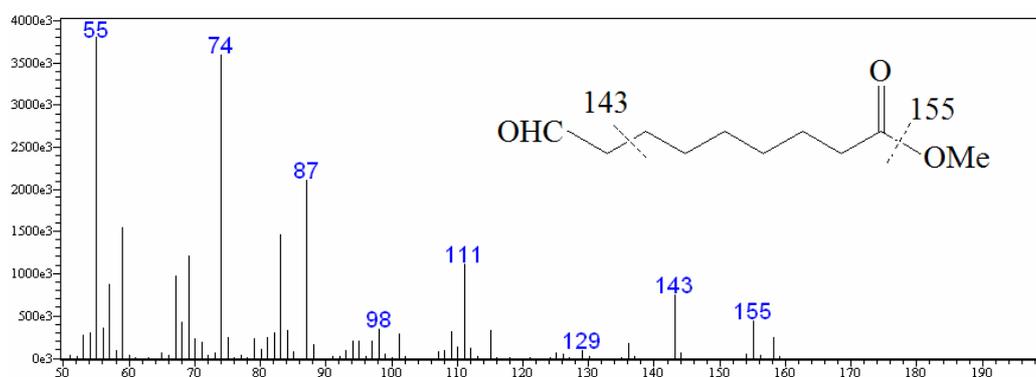


Рис. 1. Масс-спектр и структурная формула метилового эфира 9-оксононановой кислоты

Если в случае замены серина на аланин продуктов алленоксидсинтазной и гидропероксидлиазной реакций получается приблизительно равное количество, то в случае замены фенилаланина на изолейцин продуктов алленоксидсинтазной реакции

практически не наблюдалось (Рис. 2). Это свидетельствует о роли данных консервативных аминокислот в специфической функции фермента. С другой стороны, замена аспарагиновой кислоты на аргинин в ERR-триаде не привела к изменениям в характере катализа.

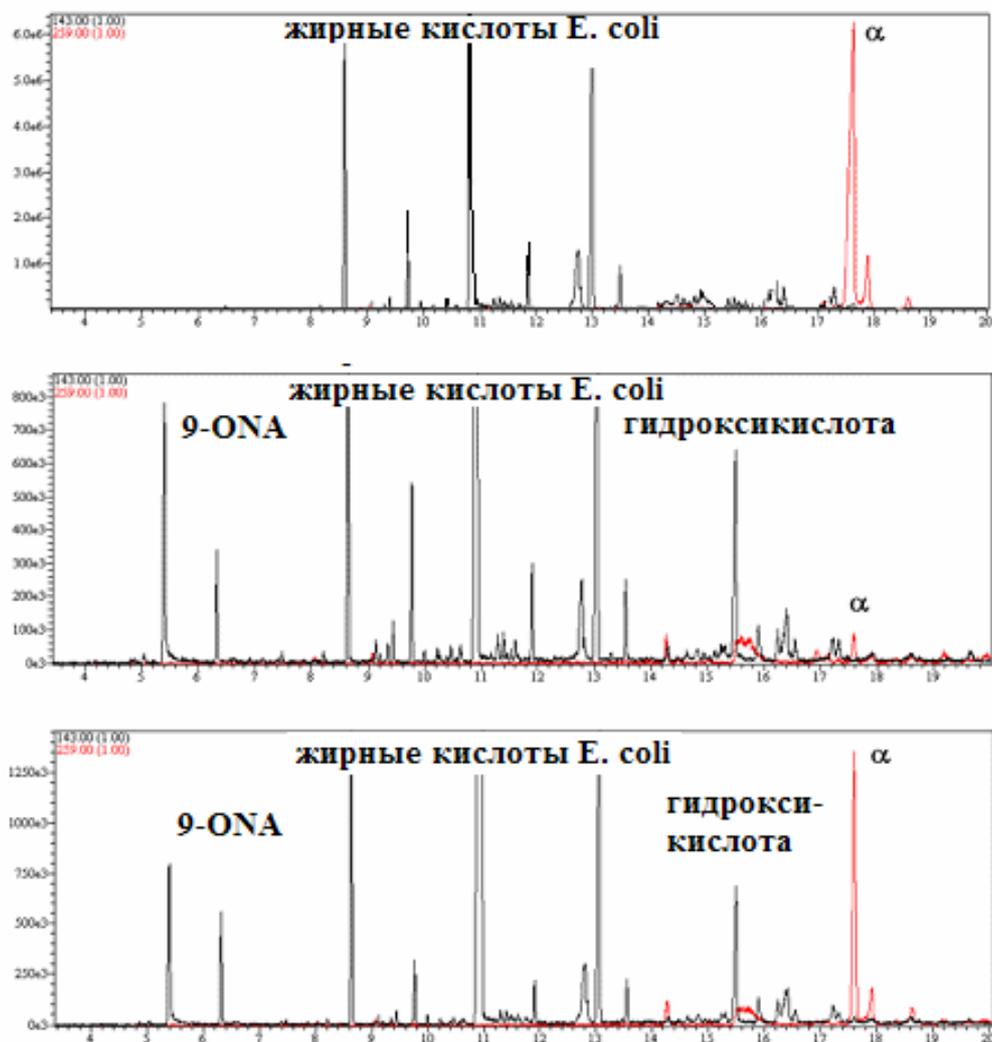


Рис. 2. Сравнение продуктов реакции LeAOS3 дикого типа с мутантами: верхний спектр соответствует реакции 9-HPOD с LeAOS3 дикого типа, средний – с мутантом F295I, нижний – с мутантом S297A. 9-ОНА – 9-оксононановая кислота,  $\alpha$  –  $\alpha$ -кетол.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в отличие от обычных алленоксидсинтаз подсемейства CYP74A, LeAOS3, принадлежащий подсемейству CYP74C является мультифункциональным ферментом, катализирующим не только синтез, но и гидролиз и циклизацию окиси аллена.

Впервые проведён сайт-направленный мутагенез гена – представителя семейства CYP74: алленоксидсинтазы CYP74C3 (LeAOS3). Обе сделанных замены в кислород-связывающем домене привели к радикальным изменениям в характере катализа. Мутант F295I проявляет активность гидропероксидлиазы. Мутант S297A проявляет двойственную активность алленоксидсинтазы и гидропероксидлиазы.

Результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу свидетельствуют о принципиальной роли кислород-связывающего домена в катализе ферментов семейства CYP74. Изменение характера катализа в результате замены единственной аминокислоты свидетельствует о близком родстве данных ферментов.

## Синтез лимонной кислоты дрожжами *Yarrowia lipolytica* при росте на отходах биодизеля

Фатыхова А.Р., Моргунов И.Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Московская область, 142290, пр-т Науки, 5, e-mail: [alfari@yandex.ru](mailto:alfari@yandex.ru)

Биодизель – это альтернативное биотопливо XXI века. В странах европейского союза, России, Америки, Украины уже приняты правительственные программы перевода значительной части дизельного парка автомобилей на биодизельное топливо. Использование биодизеля позволяет его потребителям не зависеть от мировых цен на нефть и нефтепродукты, поэтому биотопливо получает всё большее распространение во всем мире.

Сырьем для производства биодизеля могут быть различные растительные масла и животные жиры. В ходе процесса этерификации триглицериды масел гидролизуются, затем метилируются с образованием метиловых эфиров жирных кислот, которые и используются в качестве биодизеля. Побочным продуктом данного производства является технический глицерин в виде 70-80%-ного водного раствора, остатков масла и свободных жирных кислот [1]. В недавнем обзоре В.Г. Дебабова [2] отмечается, что проблема утилизации глицерин-содержащих отходов становится ключевой в процессе производства биодизеля: на каждую тонну произведенного биодизеля накапливается 100 кг технического глицерина. Ведутся интенсивные поиски возможностей переработки технического глицерина в продукты с высокой стоимостью (1,3-пропандиол, липиды, янтарная кислота).

В ходе предварительной работы нами была исследована способность к образованию лимонной кислоты (ЛК) при росте на среде с отходами биодизеля у 66 дрожжевых организмов, относящихся к разным родам (*Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*) и селекционированы природный штамм *Y. lipolytica* 704 и его мутант *Y. lipolytica* N 15 в качестве наиболее активных продуцентов. Мутант N 15 получен в результате комбинированного воздействия ультрафиолетового облучения и N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина. Мутант N 15 характеризовался отсутствием роста на среде с ацетатом и цитратом, что, по-видимому, связано с различными нарушениями в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном цикле и селекционирован как продуцент ЛК из глюкозы [3]. Подобраны условия культивирования (рН среды 5,0, высокая аэрация, концентрация глицерина в среде на уровне 20 - 70 г/л), стимулирующие процесс биосинтеза ЛК.

Целью настоящего исследования явилось изучение процесса роста *Y. lipolytica* 704 и его мутанта N 15 и биосинтеза ЛК из отходов биодизеля.

Культивирование дрожжей проводили в ферментере. При культивировании природного штамма *Y. lipolytica* 704 и его мутанта N 15 на полноценной минеральной среде отмечено значительное накопление биомассы с высоким

содержанием липидов в клетках дрожжей (до 24,8% для природного штамма и 29,9% для мутанта), в жирно-кислотном составе преобладали олеиновая кислота (55,5%) и линолевая кислота (25,7%). В условиях лимитирования роста дрожжей азотом наблюдалось снижение содержания липидов в биомассе до 18% для природного штамма и 10% для мутанта; значительных изменений в составе жирных кислот не происходило.

При лимитировании роста клеток азотом в среде культивирования на 96 ч роста накапливались значительные количества лимонных кислот. Природный штамм *Y. lipolytica* 704 продуцировал одновременно как ЛК (61,72 г/л), так и ее изоформу – трео-Ds-изолимонную кислоту ИЛК (46,6 г/л). Преимущественного синтеза ЛК удалось достичь с применением мутанта N 15. На 96 ч культивирования мутант накапливал 71,0 г/л ЛК и лишь 5,6 г/л ИЛК, выход ЛК из отходов составил 90%.

Результаты настоящего исследования показывают, что глицерин-содержащие отходы производства биодизеля являются перспективным источником углерода для роста дрожжей *Y. lipolytica* и получения ЛК. Дальнейшая работа может быть связана с доведением технологий до полупромышленного уровня в ферментерах объемом 30 и 250 л и наработкой опытных партий целевых продуктов (ЛК и биомассы).

#### **Литература:**

1. Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggeli G. (2008) In: Biomass and Bioenergy / Eds. Mitchell C.P. and Overend R.P. N.-Y.: Elsevier. - V. 32. - P. 60-71.
2. Дебабов В.Г. (2008) – Биотехнология, 1, 3-14.
3. Финогенова Т.В., Пунтус И.Ф., Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Монастырская С.Е., Моргунов И.Г., Боронин А.М. (2008) – Прикл. биохим. микробиол., 44, 2, 219-224.

## Характеристика нового биолюминесцентного штамма рода *Vibrio*

Хрульнова С.А., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б.

ФГУП "ГосНИИГенетика", 117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.

e-mail: [zavilgel@genetika.ru](mailto:zavilgel@genetika.ru)

Бактерии *Vibrio logei* – факультативные анаэробные грамотрицательные палочки, относятся к семейству *Vibrionaceae*. Бактерии *V. logei* являются патогенами личинок морских моллюсков.

В настоящей работе проведено клонирование *lux*-оперона бактерий *V. logei* (штамм маркирован как KCh1). Данный штамм изолирован из кишечника бычка *Cottida sp.* (акватория Охотского моря).

**Бактериальные штаммы и плазмиды:** *Escherichia coli* TG-1 F<sup>-</sup> *thi hsdRD5* □(*lac-pro*)/F'(traD36 *proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup>Z-M15); *E. coli* MC1061 F' *araD139* □(*ara leu*)769 *lacX74 galU galK hsdR mcrB rpsL th*; *E. coli* K-12 MG1655 F<sup>-</sup> *ilvG rfb-50 rph-1*; *E. coli* K-12 PK202 *dnaK14 dnaJ14 dks::kan* (получены от Dr. Elizabeth A. Craig, США), pUC19.

Для конструирования плазмиды pSV1, содержащую *lux*-оперон *V. logei*, хромосомальную ДНК рестрицировали по сайтам *MboI* и клонировали в вектор pUC19 по сайту *BamHI*. Для конструирования плазмиды pSV2 хромосомальную ДНК *V. logei* и вектор pUC19 рестрицировали по сайтам рестрикции *HindIII* (рис.1) На рис. 1 показаны участки *lux*-оперона *V. logei*, клонированного в векторе pUC19

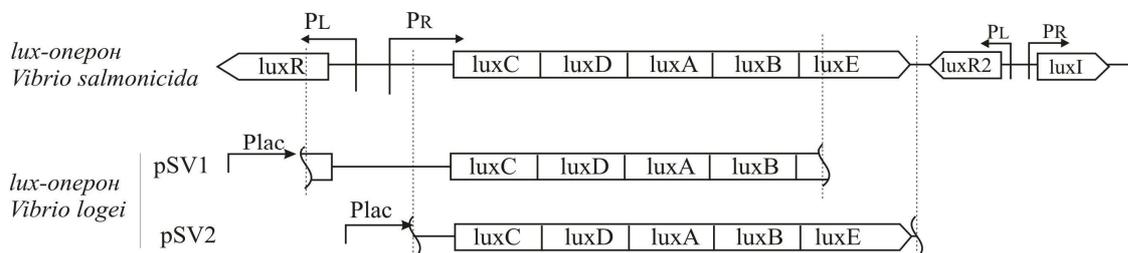


Рис 1. Схема клонирования *lux*-оперона *V. logei*

На рис. 2-А изображены кривые термоинактивации (37°C) люциферазы в клетках штаммов *E.coli* MG1655 (pSV1), *E.coli* PK202 (pSV1) и *V. logei*. При сравнении можно заключить, что люцифераза в штамме *E.coli* MG1655 более термостабильна, чем в штаммах *E.coli* PK202 и *V. logei*.

На рис.2-Б приведены зависимости ренатурации люциферазы от времени инкубации при комнатной температуре. Уровень рефолдинга термоинактивированной люциферазы измеряли в клетках *E. coli* K-12 MG1655 и K-12 PK202 *dnaK14 dnaJ14 dks::kan*, содержащих гибридную плазмиду pSV1. Бактерии росли при 28°C до середины логарифмической фазы. Затем в течение 60 мин выдерживали их при температуре 20°C для восстановления уровня свечения. После этого к суспензии клеток добавляли хлорамфеникол, и инактивировали люциферазу в течение 5 мин при 42°C в водяной бане. Рефолдинг инактивированной люциферазы проводили при комнатной температуре. В клетках штамма PK202 *dnaK14 dnaJ14 dks::kan* рефолдинг полностью отсутствует. В клетках культуры *V.*

*logei* наблюдается слабая ренатурация люциферазы, а в клетках *E. coli* MG1655 рефолдинг идёт эффективно и достигает 30-40% от исходного уровня. Пониженный уровень ренатурации в клетках *V. logei* по видимому связан или с малым содержанием белков-шаперонов, или с их не эффективным действием.

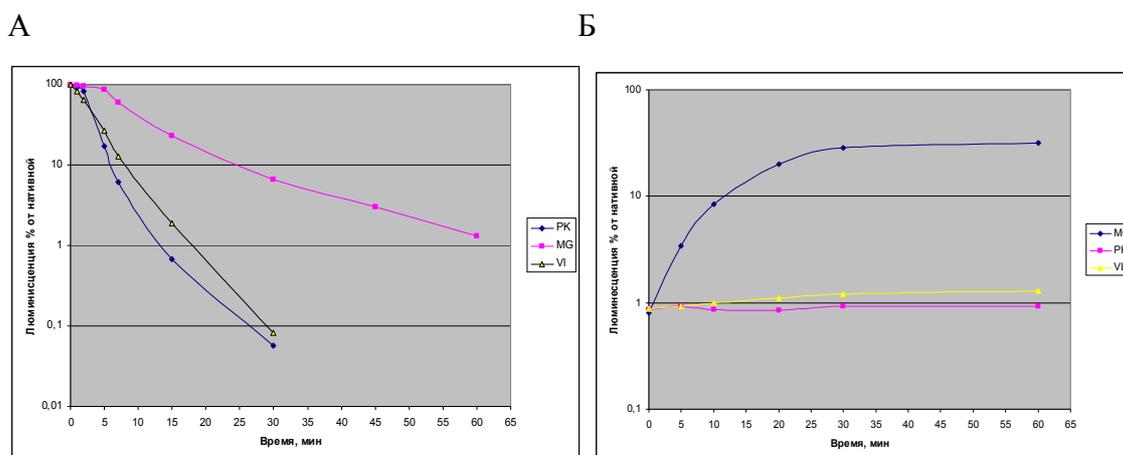


Рис 2. Термоинактивация (37°C) люциферазы *V. logei* (А). Восстановление активности (рефолдинг) термоинактивированной люциферазы *Vibrio logei*(Б). Клетки инкубированы 5 мин на 42°C до полной инактивации люциферазы. MG – штамм *E.coli* MG1655 pSV1, PK - штамм *E.coli* PK202 pSV1, VL – штамм *V. logei*

Проведено секвенирование гена 16S РНК штамма *V. logei* KCh1. Сравнительный анализ последовательности гена, кодирующего 16S РНК у морских бактерий, показывает, что наиболее близки между собой *V. logei* и *V. salmonicida*.

Анализ характеристик нового штамма рода *Vibrio* показал, что этот штамм, скорее всего, принадлежит виду *logei*. Ранее штаммы этого вида были обнаружены лишь в районе Гавайских островов. В коллекции светящихся микроорганизмов Института Биофизики СО РАН (Красноярск) *V. logei* отсутствует. Все штаммы в музее Института Биофизики СО РАН, обнаруженные в Охотском море (п-ов Камчатка), охарактеризованы как *V. fischeri*. В настоящей работе вид *V. logei* впервые обнаружен в акватории Охотского моря и, следовательно, распространён в морских водах значительно шире, чем предполагалось ранее.

### Литература:

1. Bang S.S., Baumann P., Nealson K.H. (1978) Phenotypic characterization of *Photobacterium logei* (sp. nov.), a species related to *P. fischeri*. – Curr. Microbiol., 1, 285-288.
2. Nelson E.J., Tunsjø H.S., Fidopiastis P.M., Sørum H., Ruby E.G. (2007) A novel lux operon in the cryptically bioluminescent fish pathogen *Vibrio salmonicida* is associated with virulence. – Appl Environ Microbiol., 73(6), 1825-33. Epub 2007 Feb 2.
3. Urbanczyk H., Ast J.C., Higgins M.J., Carson J., Dunlap P.V. (2007) Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. – Int J Syst Evol Microbiol., 57, 2823-9.

## Эффективность медиаторов электронного транспорта биоэлектродокаталитического окисления этанола бактериями *Gluconobacter oxydans* в биосенсорах и биотопливных элементах

Чигринова Е.Ю.

Тульский государственный университет, 300600, Тула, проспект Ленина 92,  
e-mail: [enot\\_kat@rambler.ru](mailto:enot_kat@rambler.ru)

Современное понятие биотопливного элемента ведущие исследователи в области биоэлектродокаталитического окисления расширяют до понятия «биоэлектродокаталитический топливный элемент» [1], [2]. Для такого устройства характерно не только присутствие биологического источника электронов (например, микроорганизмов) в одной кювете с электродом, но и наличие специфических биоэлектродокаталитических этапов передачи электронов, связанных с присутствием искусственных акцепторов электронов в электродном пространстве – медиаторов электронного транспорта. Одним из перспективных классов медиаторов электронного переноса, широко используемых в области биоэлектродокаталитического окисления (в ферментных биосенсорах), является ферроцен и его производные. Впервые возможность оценки эффективности медиаторов амперометрическим методом была описана в работе [3]. Данный подход можно использовать для нахождения наиболее успешных сочетаний «медиатор-биокатализатор» в различных системах, и в дальнейшем применять эти сочетания для разработки биотопливных элементов. В качестве сырья в биотопливных элементах перспективно использовать продукты переработки сельскохозяйственной продукции, например, этиловый спирт. Для детекции легкоутилизируемых спиртов перспективными могут стать медиаторные биосенсоры на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*, содержащих мембранлокализованные ферменты, что облегчает их взаимодействие с искусственными акцепторами электронов.

Целью настоящей работы явилось нахождение наиболее эффективного медиатора биоэлектродокаталитического окисления этанола целыми клетками *Gluconobacter oxydans* и его дальнейшее применение в биотопливном элементе.

Исследование проводилось с использованием медиаторной биосенсорной системы. При выборе медиатора, способного наиболее эффективно взаимодействовать с ферментами бактериальных клеток, в качестве искусственных акцепторов электронов использовали нерастворимые ферроцен и его производные.

Для электродов с иммобилизованными бактериями *Gluconobacter oxydans* были получены зависимости силы тока при варьировании концентрации субстрата (в условиях избытка медиатора) и концентрации медиатора (в условиях избытка субстрата). Для интерпретации полученных зависимостей предположили, что окисление субстрата мембранлокализованными дегидрогеназами бактериальных клеток *Gluconobacter oxydans* в присутствии медиаторов переноса электронов могут быть представлены как двухсубстратная ферментативная реакция, протекающая по механизму «пинг-понг» (первый субстрат – глюкоза, второй субстрат – медиатор). Найденные из этих зависимостей  $I_{\max}$ , константы Михаэлиса по субстрату и медиатору  $K_S$  и  $K_M$ , исходя из предложенной ранее модели [3], характеризуют процесс электродокаталитического окисления субстратов бактериями. Рассчитанные параметры представлены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры электрокаталитического окисления этанола бактериями *Glucanobacter oxydans* в присутствии медиаторов переноса электронов

Медиатор	Условия	$\Delta I_{\max}$ , мкА	$K_S$ , мМ	$\Delta I_{\max}/K_S$	$K_M$ , ммоль/г	$\Delta I_{\max}/K_M$
ФЦ	Этанол 50 мМ	2,1			0,06	38
	ФЦ 0,5 ммоль/г	2,3	2,1	1,1		
ДМФЦ	Этанол 50 мМ	4,0			0,3	13
	ДМФЦ 2,3 ммоль/г	4,0	3	1,3		
ФДМ	Этанол 50 мМ	5,1			0,05	102
	ФДМ 1,2 ммоль/г	4,6	3,7	1,3		
ЭФ	Этанол 50 мМ	1,7			0,07	24
	ЭФ 0,5 ммоль/г	1,9	1,8	1,1		
ФМК	этанол 50 мМ	2,0	2	1,1	-	-
	ФМК 1,3 ммоль/г	2,1	-	-	0,02	105

ФЦ- ферроцен; ДМФЦ- 1,1'-диметилферроцен; ФДМ-1,1'-ферроцендиметанол; ЭФ- этилферроцен; ФМК- ферроценмонокарбоновая кислота.

Из анализа предложенной модели следует, что отношение  $I_{\max}$  к  $K_S$  не зависит от типа электронного акцептора и характеризует бимолекулярное взаимодействие фермента с субстратом. То, что данные величины для всех медиаторов похожи, вытекает из принятой модели. Отношение  $I_{\max}$  к  $K_M$  - зависит от типа электронного акцептора, и дает индекс эффективности электронного акцептора. Из анализа данных величин можно заключить, что эффективность нерастворимых медиаторов увеличивается в ряду ДМФЦ<ЭФ<ФЦ<ФДМ<ФМК.

Однако, наиболее эффективные медиаторы ФМК и ФДМ легко десорбируются с поверхности электрода, что обуславливает нестабильную работу системы. Поэтому для разработки биотопливного элемента использовали ФЦ как наиболее стабильный и достаточно эффективный медиатор. Показано, что величина генерируемого электрического потенциала биотопливным элементом на основе бактерий *Glucanobacter oxydans* и ферроцена при окислении субстрата составила 130 мВ. Напряжение и ток биотопливного элемента при внешней нагрузке 10 кОм составили 12 мВ и 1 мкА, а внутреннее сопротивление – 120 кОм.

#### Литература:

1. Ikeda T., Kano K. (2003) Bioelectrocatalysis-based application of quinoproteins and quinoprotein-containing bacterial cells in biosensors and biofuel cells. – Biochimica et Biophysica Acta, 1647? 121-126
2. Davis G., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Turner A.P.E. (1983) . Bioelectrochemical fuel cell and sensor based on a quinoprotein, alcohol dehydrogenase. – Enzyme Microb. Technol. 5? 383– 388
3. Ikeda T., Kurosaki T., Takayama K., Kano K. (1996) Measurements of oxidoreductase-like activity of intact bacterial cells by an amperometric method using a membrane – coated electrode. – Anal. Chem. 68? 192-196.

## Скрининг дрожжевых организмов-продуцентов янтарной кислоты

Юсупова А.И., Камзолова С.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
142290, Пушкино, Московская область, пр-т Науки, 5, e-mail: [alsyyy@rambler.ru](mailto:alsyyy@rambler.ru)

ЯК является основным метаболитом цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и занимает ключевое положение в обмене веществ живых организмов. ЯК широко используется в химической промышленности для получения полиэфирных и алкидных смол. ЯК входит в состав биodeградируемых пластмасс [1]. Важными областями применения ЯК стали пищевая промышленность и здравоохранение. Установлено, что ЯК является активатором физиологических функций организма и может быть использована в качестве природного профилактического и лечебного средства [2]. В настоящее время ежегодная потребность в ЯК в мире составляет более 15 тыс. тонн в год и к 2020 году возрастет до 36 тыс. тонн в год.

Традиционно ЯК производится сложным химическим синтезом или её получают с помощью химической переработки янтаря. Однако, оба процесса дорогостоящие. В последние годы отмечается интерес к производству ЯК микробиологическим путем. Это обусловлено большей экологической чистотой препаратов, полученных микробиологическим синтезом.

Традиционными продуцентами ЯК служат анаэробные бактерии. Имеется только несколько работ по исследованию синтеза ЯК у дрожжей и грибов. В частности, синтез ЯК обнаружен у дрожжей рода *Candida* при их культивировании на *n*-алканах [3] и на этаноле [4]. Однако продолжения эти работы не получили.

Поэтому целью настоящего исследования являлось изучение возможности синтеза ЯК различными дрожжевыми организмами и отбор высокоактивных штаммов-продуцентов ЯК.

Скрининг проводили среди 33 штаммов дрожжей из родов *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* и *Torulopsis*. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол. Способность к экскреции ЯК отмечалась у 29 из 33 исследуемых штаммов и только у 4-х штаммов ЯК либо отсутствовала в среде, либо накапливалась в ней в чрезвычайно низких количествах (ниже 0.1 г ЯК/г сухих клеток). 18 штаммов синтезировали ЯК в количестве до 0.1 ЯК/г клеток, 9 штаммов образовывали ЯК в количестве от 0.1 до 0.5 ЯК/г клеток. На рисунке 1 представлена сравнительная характеристика продуктивности синтеза ЯК у некоторых штаммов дрожжей родов *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* и *Saccharomyces*.

Наибольшей продуктивностью синтеза ЯК обладали два штамма дрожжей - *C. zeylanoides* и *C. catenulata*, которые и были отобраны для последующей работы в качестве продуцентов ЯК из этанола (см. рис.1).

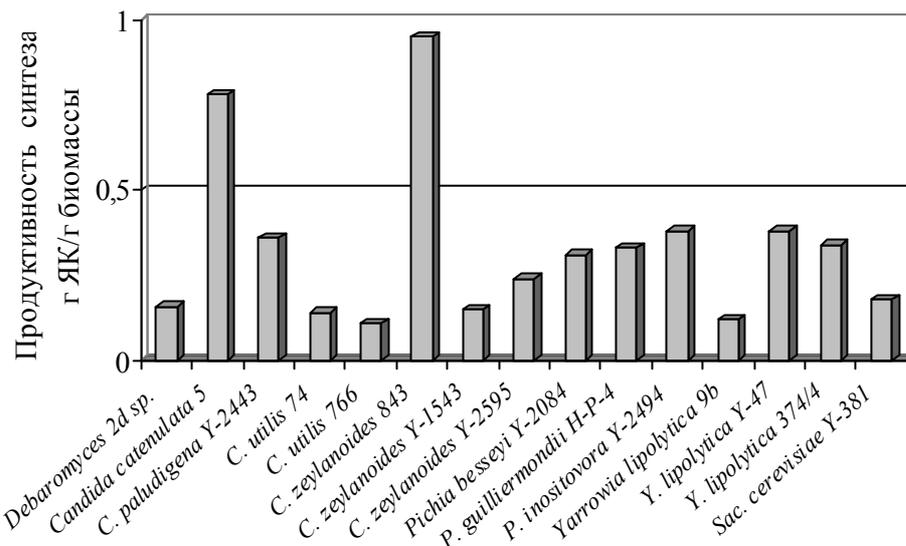


Рис 1. Продуктивность синтеза ЯК у дрожжей родов *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* и *Saccharomyces*

Кислотообразующую способность отобранных штаммов изучали выращиванием их в 10-ти литровых ферментерах АНКУМ-2М. Было показано, что у дрожжей *C. catenulata* и *C. zeylanoides* экскреция ЯК начиналась в момент перехода культуры в фазу замедления роста (после 24 ч). На конец культивирования (96 ч) штамм *C. catenulata* накапливал 6.7 г/л ЯК, а *C. zeylanoides* на 68 ч культивирования накапливал 9.4 г/л ЯК (рис. 2).

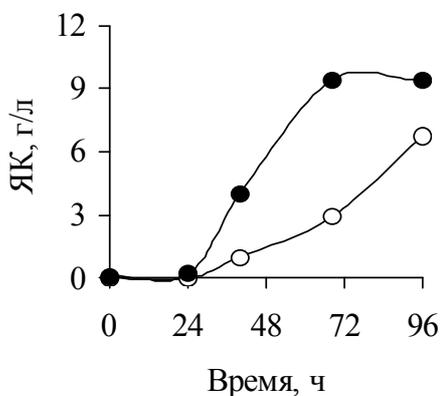


Рис. 2. Динамика накопления ЯК у *C. catenulata* (1) и *C. zeylanoides* (2)

#### Литература:

1. Zeikus J.G., Jain M.K., Elankova P.E. (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products – Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 545–552.
2. Кондрашова М.Н. (2002) Гормоноподобное действие янтарной кислоты – Вопр. биол. мед. фармац. химии., 1, 7.
3. Sato M., Nakahara T., Yamada K. (1972) Fermentative production of succinic acid from n-paraffin – Agr. Biol. Chem., 36, 1969-1974.
4. Ермакова И.Т., Мандева Р.Д. (1981) Экскреция метаболитов дрожжами родов *Torulopsis*, *Pichia*, *Debaromyces* и *Hansenula* при лимитировании их роста источниками N, P, S или Mg – Микробиология, 50, 476-481.

## **Наномодификация клеточной поверхности пробиотических лактобактерий как основа повышения их адгезивных свойств: роль оксида азота**

Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н.

Казанский государственный университет, кафедра микробиологии,  
420008 Казань, Кремлевская, 18. e-mail: [yadinka@mail.ru](mailto:yadinka@mail.ru).

Оксид азота (NO) является одним из важнейших биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. Функциональная активность NO в клетках млекопитающих обеспечивается его генерацией из L-аргинина, катализируемой семейством изоферментов NO-синтаз (NOS) [1]. При достаточной изученности путей синтеза и функций этой молекулы у эукариот, процесс бактериального синтеза NO, а также его физиологический смысл изучены мало.

В настоящей работе установлена роль бактериального оксида азота NO-синтазного происхождения как фактора изменения морфофизиологического состояния наноструктуры поверхности промышленно значимых пробиотических бактерий *Lactobacillus plantarum*.

Объектом исследования служила культура *L. plantarum* 8P-A3, выделенная нами из препарата «Лактобактерин сухой» (ФГУП «Пермское НПО «Биомед»). Комплексом современных методов, включающим геномный анализ и прямые методы регистрации оксида азота (ЭПР, флуоресцентное окрашивание) мы впервые установили их способность образовывать NO [2-4]. Было показано, что данный штамм не образует NO в процессе денитрификации, однако обладает, подобно клеткам млекопитающих, NO-синтазной активностью. Определены также условия индукции NO-синтазной активности у лактобацилл. Мы показали, что в соответствии с явлением «парадокса L-аргинина» данная аминокислота активирует образование регуляторной молекулы оксида азота у *L. plantarum* 8P-A3 [4]. Существенно, что индукция микробного синтеза NO сопровождалась изменением морфофизиологического состояния структуры поверхности бактерий, характерным для образования S-слоя (рис. 1). По-видимому, синтезируемый при ферментативном окислении L-аргинина оксид азота выполняет роль регуляторного фактора, запускающего экспрессию генов S-белков. S-слои лактобацилл представляют собой расположенный над клеточной стенкой, регулярно построенный, поверхностный слой белка или гликопротеина толщиной 5-25 нм и играют ключевую роль в адгезии молочнокислых бактерий на эпителии кишечника человека и животных [5].

Дальнейшее изучение закономерностей биосинтеза и функций оксида азота у комменсальных кишечных бактерий *L. plantarum* позволит разработать фундаментальные основы практического манипулирования внутриклеточными регуляторами на молекулярном уровне, а также наметить конкретные подходы к повышению адгезивных свойств пробиотических препаратов, созданных на основе лактобацилл.

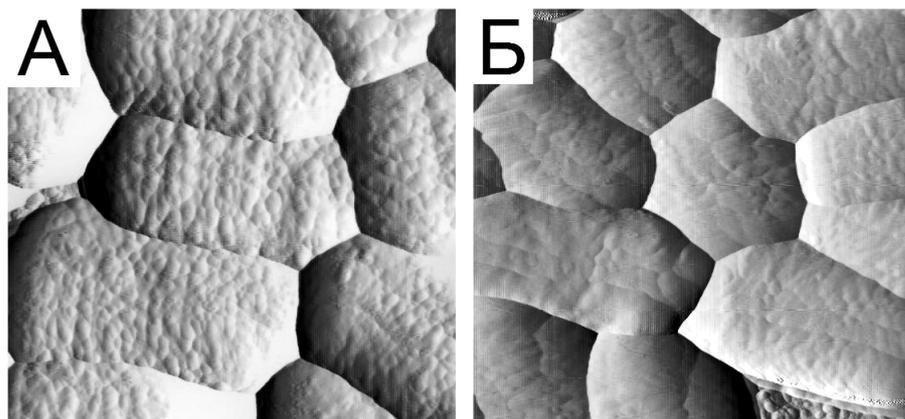


Рис. 1. Модификация поверхности клеток *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 под действием 10 мМ L-аргинина (Б). В контрольном варианте (А) бактерии выращивали на среде MRS без дополнительного внесения аминокислот. АСМ-изображения получены полуконтактным методом на воздухе при комнатной температуре в режиме сигнала рассогласования с разрешением 1024×1024 точек. Размер скана 3 × 3 мкм.

Работа поддержана грантом РНП.2.1.1.1005, программой «Михаил Ломоносов» DAAD и Минобра РФ (А/06/91824) и ГК ФЦКП КГУ 02.451.11.7019. Авторы выражают благодарность Бойерляйну К. (Институт фармакологии г. Гиссен, Германия) за помощь в проведении флуоресцентной микроскопии.

#### Литература:

1. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition – *Biochem. J.*, 357, 593–615.
2. Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н., Аганов А.В., Силкин Н.И., Зверев Д.Г. (2006) Альтернативные пути образования оксида азота у лактобацилл: обнаружение возможной NO-синтазной активности методом ЭПР – *Микробиология*, 75, 6, 731-736.
3. Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. (2007) Геномные детерминанты биосинтеза оксида азота у *Lactobacillus plantarum*: потенциальные возможности и действительность – *Молекулярная биология*, 41, 5, 900-907.
4. Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. (2007) Детекция NO-синтазной активности лактобацилл методом флуоресцентного окрашивания (краткое сообщение) – *Микробиология*, 76, 4, 570-572.
5. Schär-Zammaretti P., Ubbink J. (2003) The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations – *Biophys. J.*, 85, 4076–4092.

