

КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ПРОМОТОРОВ *BACILLUS*

Научный руководитель – Гнучих Евгений Юрьевич

Синякова Кристина Андреевна

Выпускник (бакалавр)

Московский политехнический университет, Москва, Россия

E-mail: sin.cristina1@yandex.ru

Бациллы – это грамположительные, спорообразующие бактерии, способные синтезировать и секретировать в культуральную среду большие количества экзоферментов, антибиотиков, инсектицидов, аминокислот, витаминов и других веществ. *Bacillus subtilis* и родственные виды – безопасны, непатогенны, им присвоен статус *GRAS* (*Generally Regarded As Safe*) [2]. Указанные свойства делают бациллы важным объектом биотехнологии. В настоящее время генная инженерия бацилл предполагает использование челночных плазмид, их конструирование и наработку в клетках *Escherichia coli*. Клонирование генов бацилл в челночные плазмиды может быть сложным, что связано с тем, что промоторы бацилл, как правило, хорошо работают в клетках *E. coli*, а продукты гетерологичных генов могут оказывать токсичный эффект, что приводит к сложности или невозможности получения рекомбинантных клонов или наработки плазмиды [1,3].

Нами была сконструирована плаزمида для клонирования библиотек и селективного поиска высокоспецифичных промоторов бацилл. Принцип селекции высокоспецифичных промоторов основан на комбинации негативного селективного отбора с использованием токсина CsdB, который убивает клетки *E. coli*, и положительной селекции на хлорамфениколе в клетках *B. subtilis* с последующей оценкой силы промотора по люминесценции с помощью *lux*-оперона. Были клонированы библиотеки из геномов *B. licheniformis*, *B. pumilus* и бактериофага SPP1 и отобран ряд плазмид, содержащих фрагменты ДНК с высокоспецифичными промоторами, при этом уровень люминесценции в клетках *B. subtilis* на три-четыре порядка выше, чем в клетках *E. coli* при нормировании по OD₆₀₀.

В настоящей работе для определения старта транскрипции мРНК и выявления последовательностей промоторов в клонированных фрагментах из клеток *B. subtilis*, содержащих плазмиды, была выделена тотальная РНК и проведена обратная транскрипция с использованием ревертазы Mint. В промотор-содержащих последовательностях определены области +1 старта транскрипции и вероятные -10, -35 области промоторов. Промоторы повторно клонированы в «минимальной» последовательности. Измерения силы промоторов показали высокий уровень экспрессии в *B. subtilis* и низкий – в клетках *E. coli*, различающийся на два-четыре порядка при нормировании по OD₆₀₀, у части промоторов эффект «специфичности» снижен, вероятно, из-за действия ρ -фактора в клетках *E. coli*. В целом, промоторы обладают хорошими характеристиками специфичности для клеток *B. subtilis* и могут быть использованы в биотехнологии для клонирования генов с потенциально токсичными продуктами для *E. coli*, без негативных эффектов на этапе конструирования челночных плазмид.

Источники и литература

- 1) Amitai G., Sorek R. PanDaTox: a tool for accelerated metabolic engineering // Bioengineered. 2012. V. 3. No. 4. С. 218–221.
- 2) Borriss R. et al. Bacillus subtilis, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement // Microbial biotechnology. 2018. V. 11. No. 1. С. 3–17.

- 3) Lee S. H., Soderlund D. M. Cloning and maintenance of the housefly sodium channel gene using low copy number vector and two sequential host strains // Journal of Asia-Pacific Entomology. 2009. V. 12. No. 1. С. 51–53.