

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.254.22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Материалы и методы исследований.** В работе были использованы штаммы: *Br. flavum* НК-19А (*ile*<sup>-</sup>, *D-ser*<sup>s</sup>, *ArgHx*<sup>r</sup>, *TA*<sup>r</sup>, коллекционный номер по ЦДМ – ИНМИА 11834) [6], *C. glutamicum* (*arg*<sup>-</sup>), *E. coli* ХА4 (*F*<sup>-</sup> *argA nalA λ*<sup>-</sup> *λ*<sup>S</sup> *trpR hsdR*), *E. coli* XS1D2R (*F*<sup>-</sup>  $\Delta$ (*ppc-argE*)101 *nalA rpoB λ* *hsdR recA*), *G. Stearothermophilus* NCIB 8224 (дикий тип), а также *E. coli* – *C. glutamicum* челночный экспрессионный вектор рЕС-ХК99Е (GenBankAY219683).

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

Синтетической средой для культивирования штаммов *Br. flavum* и *C. glutamicum* послужила среда Гловера следующего состава, %: NH<sub>4</sub>Cl – 0.5; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 0.1; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.1; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0.025; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0.001; MnSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O – 0.001; агар «Difco» – 1.6; глюкоза – 0.8, а также биотин – 100 мкг/л; тиамин – 100 мкг/л; L-аминокислоты – 40 мкг/мл.

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

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

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

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

Для определения аргининпродуцирующей способности была использована ферментационная среда следующего состава, %: сахароза – 15.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.3; рыбная паста – 1.2;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.001;  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0/001;  $\text{CaCO}_3$  – 5.0; биотин – 500 мкг/л; тиамин – 500 мкг/л; L-изолейцин – 300 мкг/мл (рН 7.6) [12].

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

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

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

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

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

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

Для амплификации гена *argJ* использовались следующие праймеры:

Forward

5'-CCGGAATTCACGATCACAACAAACGGG

EcoRI

Reverse

5'-CGCGGATCCTTACGTCCGATAGCTGGCG

BamHI

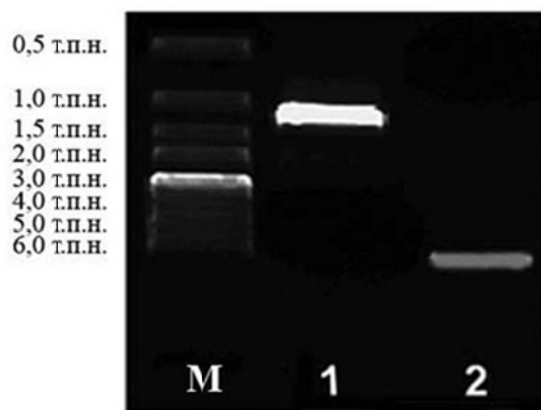


Рис. 1. Электрофореграмма PCR-продукта гена *argJ* *G. stearothermophilus* и вектора pEC-ХК99Е: М – ДНК ladder; 1 – PCR-продукт гена *argJ* *G. stearothermophilus* размером ~ 1250 п.н.; 2 – вектор pEC-ХК99Е размером 7,02 т.п.н., обработанный ферментами *EcoRI/BamHI*.

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

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

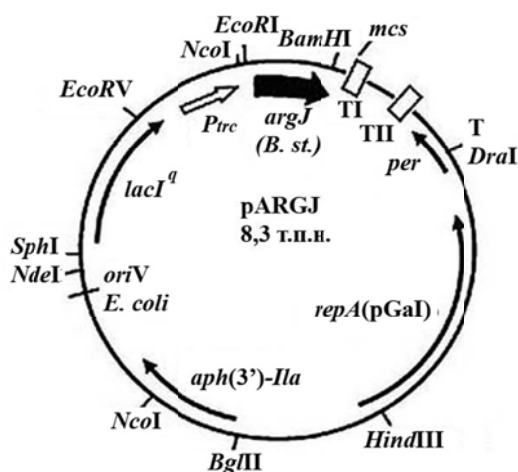


Рис. 2. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды pARGJ. Жирной стрелкой обозначен ген *argJ* *G. stearothermophilus*.

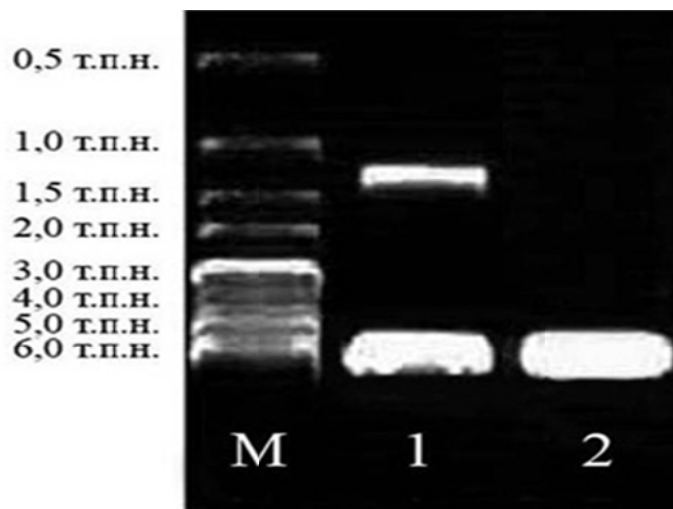


Рис. 3. Электрофореграмма рестриктов рекомбинантной плазмиды pARGJ и вектора pEC-XK99E: М– DNA ladder; 1 – *EcoRI/BamHI* рестрикты рекомбинантной плазмиды pARGJ; 2 – *EcoRI/BamHI* рестрикт вектора pEC-XK99E.

Таким образом, наличие клонированного гена *argJ* в составе сконструированной рекомбинантной плазмиды pARGBJ было подтверждено результатами комплементации мутаций *argA* и *argE* генов в ауксотрофных штаммах *E. coli* ХА4 (*argA*<sup>-</sup>) и *E. coli* XS1D2R (*argE*<sup>-</sup>), а также рестрикционным анализом этой плазмиды.

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

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

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

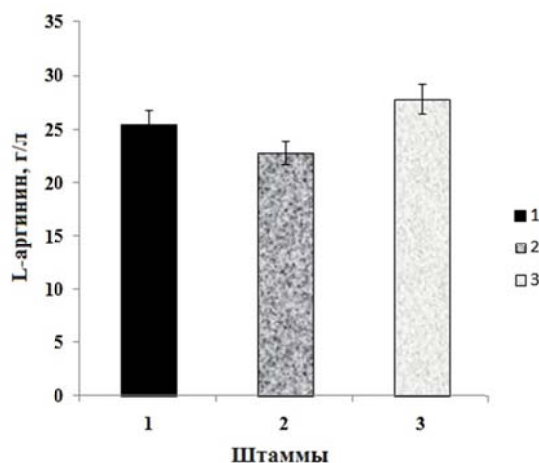


Рис. 4. Количество синтезированного L-аргинина штаммом-реципиентом и рекомбинантными штаммами: 1 – штамм-реципиент *Br. flavum* НК-19А; 2 – рекомбинантный штамм *Br. flavum* НК-19А (pEC-ХК99Е), содержащий вектор; 3 – рекомбинантный штамм *Br. flavum* НК-19А (pARGJ), содержащий плазмиду.

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

Рекомбинантная плазида pARGJ, несущая ген *argJ*, продукт которой не ингибируется L-аргинином, увеличивает аргининпродуцирующую способность штамма *Br. flavum* НК-19А на 5.0 г/л по сравнению с тем же штаммом, содержащим вектор pEC-ХК99Е.

НПЦ «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА  
e-mail: anichka\_h@mail.ru

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

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

Осуществлено молекулярное клонирование гена *argJ* термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* на *Escherichia coli* – *Corynebacterium glutamicum* челночном экспрессионном векторе pEC-ХК99Е в клетках коринеформных бактерий. Сконструированная рекомбинантная плазида pARGJ была использована для создания нового штамма-производителя аргинина. В качестве реципиента использован полученный нами ранее штамм *Brevibacterium flavum* НК-19А, синтезирующий до 25.0 г/л L-аргинина. Созданный новый рекомбинантный штамм, содержащий гетерологичный ген *argJ* термофильной бактерии, обеспечивает

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

**Հ. Օ. Քոլոյան, Ս. Ու. Ավետիսյան, Մ. Հ. Պարոնյան, Ա. Ս. Հովսեփյան**

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

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

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

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

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

**Литература**

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



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