

УДК 579.254.26

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФОСФОНАТНОГО ОПЕРОНА

© 2013 Р.М. Бузиков, С.Н. Янов, И.П. Погорельский

Вятский государственный университет, г. Киров

Поступила в редакцию 27.05.2013

В настоящей работе представлены результаты получения рекомбинантных штаммов *E. coli* с конститутивной экспрессией фосфонатного оперона с помощью сайт-специфичной системы рекомбинации бактериофага.

Ключевые слова: *фосфонаты, С-Р лиаза, глифосат, ксенобиотики, биоремедиация, фосфонатный оперон*

Широкое применение агрохимикатов вывело сельскохозяйственные технологии на новый уровень, сделало возможным переход к интенсивному принципу ведения хозяйства, что, к сожалению, сопровождается загрязнением почвы и сельхозпродукции, особенно в случаях, связанных с несоблюдением норм внесения агрохимикатов и СА-технологий. У многих агрохимикатов со временем обнаруживаются свойства, отрицательно влияющие на природные экосистемы и здоровье человека. В результате длительного и неконтролируемого применения агрохимикатов сельхозпроизводителями на территории СНГ осталось множество свалок зачастую неизвестных препаратов или их смесей, существенно ухудшающих экологическую обстановку в регионах. До сих пор ситуация не изменилась, нередки случаи использования уже запрещенных веществ и препаратов. Часть ксенобиотиков не может быть достаточно эффективно переработана биотической компонентой экосистемы. Некоторые из них не только устойчивы к физическому воздействию, но и к биодеструкции почвенными микроорганизмами. Более того, они обладают антибиотической активностью.

Одной из групп подобных ксенобиотиков являются фосфонаты (например, производные метилфосфоновой кислоты) – сильные органические фосфатные хелаторы, которые удерживают положительно заряженные ионы Mn, Co, Fe, Zn, Cu и др., необходимые для протекания физиологических процессов в почве, организмах растений и животных. Представителем данной группы соединений является глифосат – неселективный системный гербицид, использующийся для борьбы с сорняками, а его этил- и фенил- фосфонатные производные как инсектициды для борьбы с

насекомыми. Глифосат занимает среди гербицидов первое место в мире по производству [1]. Долгое время считалось, что для млекопитающих глифосат малотоксичен (ЛД₅₀: для крыс 4900 мг/кг, для кроликов 3800 мг/кг), но при совместном воздействии с другими так называемыми «инертными компонентами» токсичность существенно увеличивается. Были выявлены онкогенный и мутагенный эффекты глифосата [2, 3]. Препарат может поступать с пищей в организм человека, отрицательно влияет на синтез ароматических аминокислот растениями, оказывает угнетающее воздействие на микрофлору кишечника [5].

Характерной особенностью фосфонатов является наличие С-Р связи, устойчивой не только к химическому гидролизу и фотолизу, но и к термическому расщеплению [6]. Благодаря этому фосфонаты способны долгое время сохраняться в почве, быстро адсорбируясь на ее частицах. Многие микроорганизмы в определенных условиях способны к биодegradации фосфонатов с помощью различных ферментов: фосфоноацетальдегидгидролазы (разлагает 2-аминоэтилфосфоновую кислоту); фосфоноацетатгидролазы (деградирует фосфоноацетат), фосфонопируватгидролазы и С-Р лиазы – фермента с наиболее широким спектром разлагаемых фосфонатов. Проблема заключается в том, что биодegradация фосфонатов ингибируется даже невысокими концентрациями неорганических фосфатов, которые являются более доступным источником фосфора для микроорганизмов [6]. В природе практически не встречаются условия, оптимальные для эффективной экспрессии фосфонатного оперона – группы генов, отвечающих за синтез С-Р лиазного ферментативного комплекса и его функционирование. Для определения перспектив и направлений исследования проблемы биодegradации фосфонатных ксенобиотиков необходима селекция микроорганизмов, способных к синтезу С-Р лиазы не только на минимальной питательной среде, но и в почве, содержащей значительное количество фосфатов. Метаболизм фосфонатов и структура фосфонатного оперона требуют более подробного изучения, но на сегодняшний день полученных

Бузиков Рустам Мансурович аспирант. E-mail: bakter@kirovnet.net

Янов Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии. E-mail: yanov1947@mail.ru

Погорельский Иван Петрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии. E-mail: ipogorelsky@inbox.ru

данных уже достаточно для того, чтобы решить проблему биоремедиации почвы с использованием полученных методами генной инженерии, позволяющих получить четкий, предсказуемый конечный результат.

Фосфонатный оперон *E. coli*, размером 10,9 т.п.н., состоит из 14 генов: *phnCDEFGHIJKLMNOP*, которые транскрибируются с одного промотора, расположенного перед геном *phnC*. Продукты генов *phnC*, *phnD* и *phnE* кодируют транспортную систему алкилфосфонатов. Гены *phnG-phnM* кодируют связанные с мембраной компоненты С-Р лиазного комплекса [8]. Продукты генов *phnN* и *phnP* – вспомогательные белки С-Р лиазы. Гены *phnN*, *phnO* кодируют регуляторные белки [9, 10]. Промотор фосфонатного оперона содержит РНО-бокс (СТГТТАГТКАСТТТТААТ), сходный с обнаруженной в промоторах *rho*-генов, что позволяет предположить общность с *rho*-регулоном, который обуславливает ответ микробной клетки на дефицит фосфора и подвергается весьма сложной регуляции, связанной с метаболизмом фосфора [7, 10, 11].

Наиболее приемлемым подходом является невмешательство в сложную систему регуляции фосфатного обмена бактериальной клетки, а исключение из нее фосфонатного оперона. Для этого необходимо заменить регулируемый промотор этого оперона на конститутивный. При этом целесообразнее не клонировать оперон протяженностью 10,9 т.п.н. в вектор с конститутивным промотором, а вставить этот промотор перед геном *phnC* фосфонатного оперона в месте его локализации (хромосоме бактерии). Методами классической генетики такая манипуляция трудноосуществима. В этой связи было необходимо разработать универсальную систему для встраивания фрагментов ДНК, в том числе и содержащие регуляторные последовательности (промоторы, операторы,

эн-хансеры и др.), в выбранное место в геноме бактерии. С этой целью была сконструирована плаزمиды с генами интеграции бактериофага λ (гены *exo*, *β*, *γ* встроены в хелперную плазмиду *pTrcHis2C*) (рис. 1).

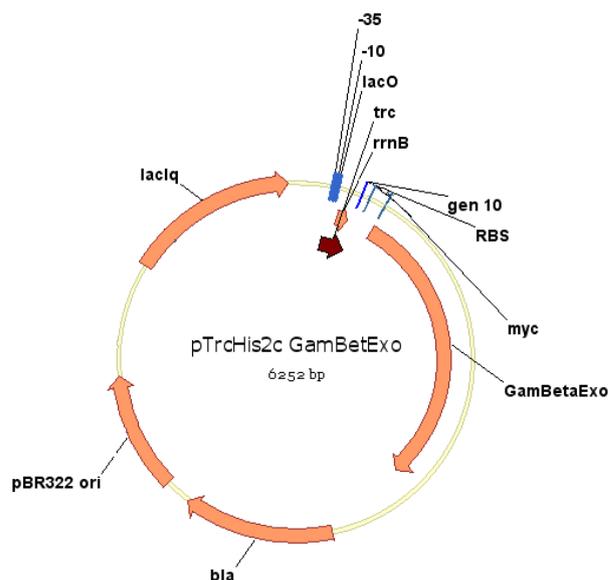


Рис. 1. Вектор *pTrcHis2c* со вставкой генов *exo*, *β*, *γ*

В качестве конститутивного промотора использовался антитетрациклиновый промотор плазмиды *pSC 101*, который амплифицировался вместе с геном резистентности к тетрациклину с помощью праймеров, состоящих из двух частей: 3'-часть комплементарна фланкирующим конститутивный промотор последовательностям, а 5'-часть гомологична участкам, фланкирующим промотор фосфонатного оперона (рис. 2).

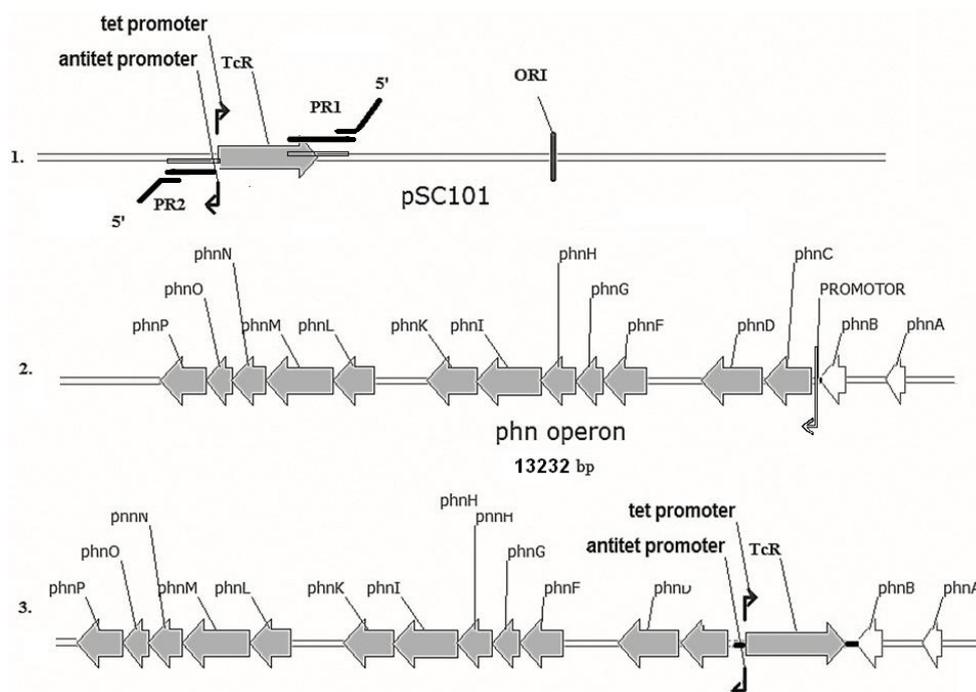


Рис. 2. Механизм замены промотора фосфонатного оперона

Получение штаммов кишечной палочки с конститутивной экспрессией фосфонатного оперона сводилось к следующему: компетентные клетки кишечной палочки *E. coli* Top10 трансформировали ДНК хелперной плазмиды pTcHis2 с генами α , β , γ и амплифицированного фрагмента pSC101. Для селекции трансформантов использовали плотную питательную среду с добавлением 100 мкг/мл ампициллина (маркер хелперной плазмиды) и 10 мкг/мл тетрациклина (маркер встраиваемого фрагмента). Полученные трансформанты изучали на наличие вставки гена устойчивости к тетрациклину с помощью ПЦР с праймерами Pr1 и Pr2. Для дальнейшей работы было отобрано 13 клонов, способных к расщеплению изопропилового эфира метилфосфоновой кислоты даже в присутствии в питательной среде неорганического фосфата. При множественных пересевах в жидкой питательной среде без селективно давления антибиотиков были получены варианты кишечной палочки, утратившие резистентность к ампициллину (маркер хелперной плазмиды), но сохранившие устойчивость к тетрациклину. Следует заметить, что реципиентный штамм *E. coli* Top10 является ауксотрофом и не способен конкурировать с аборигенной микрофлорой природных экологических ниш. В дальнейшем разработанную технологию получения штаммов с конститутивной экспрессией фосфонатного оперона планируется использовать применительно к почвенным микроорганизмам с целью разработки биотехнологии для ремедиации загрязненных фосфонатами территорий.

Выводы: итогом работы является разработка методологической основы получения штаммов микроорганизмов, выделенных из различных экологических ниш, с модифицированной регуляцией фосфонатного оперона, перспективных для использования при создании биопрепарата и технологии его применения при очистке территорий от фосфонатных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Gasnier, C.* Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines / *C. Gasnier et al.* // *Toxicology*. 2009. Vol. 10. P. 33-35.
2. *De Roos, J.* Cancer Incidence among Glyphosate-Exposed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study / *J. De Roos et al.* // *Environmental Health Perspectives*, 2005, P. 113.
3. *Dallegrave, E.* The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats / *E. Dallegrave et al.* // *Toxicology Letters*. 2003. Vol. 142(1-2). P. 45-52.
4. *Hardell, L.* A Case-Control Study of Non-Hodgkin Lymphoma and Exposure to Pesticides / *L. Hardell, M. Eriksson* // *Cancer*. 1999. Vol. 85. P. 1353-1360.
5. *Brandli, D.* Herbicides found in Human Urine / *D. Brandli, S. Reinacher* // *Ithaka Journal*. 2012. Vol. 1. P. 2-4.
6. *Нифантьев, Э.Е.* Химия фосфорорганических соединений. – М.: Изд-во МГУ, 1971. 24 с.
7. Микробные биотехнологии ремедиации почв, загрязненных фосфорорганическими пестицидами [электронный ресурс] // Коммерческая биотехнология. 01.07.09 URL: <http://www.cbio.ru/>
8. *Metcalfe, W.W.* Mutational Analysis of an *Escherichia coli* Fourteen-Gene Operon for Phosphonate Degradation, Using TnphoA' Elements / *W.W. Metcalfe, B.L. Wanner* // *Journal of bacteriology*. 1993. Vol. 6. P. 3430-3442.
9. *Jochimsen, B.* Five phosphonate operon gene products as components of a multi-subunit complex of the carbon-phosphorus lyase pathway / *B. Jochimsen et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 7. P. 12-28.
10. *Datsenko, K.A.* One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / *K.A. Datsenko, B.L. Wanner* // Communicated by Jonathan Beckwith, Harvard Medical School, Boston, MA (received for review February 13, 2000).
11. *Kamat, S.S.* Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria / *S.S. Kamat, H.J. Williams, F.M. Raushel* // *Nature*. 2011. Vol. 480. P. 570-573.

METHOD OF RECEIVING THE *ESCHERICHIA COLI* STRAINS WITH CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PHOSPHONATE OPERON

© 2013 R.M. Buzikov, S.N. Yanov, I.P. Pogorelskiy

Vyatka State University, Kirov

In this work results of receiving the recombinant strains of *E. coli* with constitutive expression of phosphonate operon with the help of site-specific system of bacteriophage recombination are presented.

Key words: *phosphonates, LiAZ S-R, glyphosat, xenobiotics, bioremediation, phosphonate operon*

Rustam Buzikov, Post-graduate Student. E-mail: bakter@kirovnet.net
Sergey Yanov, Doctor of Biology, Professor at the Microbiology Department. E-mail: yanov1947@mail.ru
Ivan Pogorelskiy, Doctor of Medicine, Professor at the Microbiology Department. E-mail: ipogorelsky@inbox.ru