

Дайнеко А.В.*, Булатовский А.Б., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, НЕСУЩЕЙ ГЕН КСАНТОЗИНФОСФОРИЛАЗЫ *Escherichia coli*

Введение. Биологические исследования важнейшего кофактора НАД⁺, присутствующего во всех живых клетках, предоставили возможность изучить патогенез процесса старения организма [1]. Истощение уровня содержания данного химического соединения в организме стало главной причиной возрастного функционального спада и появления болезней старческого возраста. Существует несколько путей синтеза кофактора НАД⁺, но одним из важнейших является salvage-путь, в ходе которого он продуцируется из предшественников: никотинамида, никотинамидрибозида и никотинамидмононуклеотида. Повышая уровень прекурсоров, возможно значительно восполнять уровень НАД⁺, утраченного в процессе старения организма [2]. Исследования зарубежных авторов показали, что никотинамидрибозид является наиболее альтернативным предшественником данного кофактора. С помощью генетических и биохимических подходов было обнаружено, что фермент ксантозинфосфорилаза в клетках *Escherichia coli*, известный также как пуриннуклеозидфосфорилаза-II, способен синтезировать никотинамидрибозид из никотинамида. Фермент ксантозинфосфорилаза использует никотинамид гораздо менее эффективно, чем его типичные субстраты (то есть аналоги пурина), указывая на то, что никотинамид является нетипичным субстратом. Поэтому возможность

конвертировать никотинамид в никотинамидрибозид оказывается «побочным эффектом» для данного фермента. Однако такой побочный эффект является достаточным для поддержания выживаемости кишечной палочки [3].

В связи с изложенным выше, целью настоящей работы явилось: конструирование рекомбинантного вектора, несущего ген фермента ксантозинфосфорилазы в клетках *E. coli*, который катализирует процесс получения никотинамидрибозида – основного промежуточного соединения важнейшего кофермента НАД⁺.

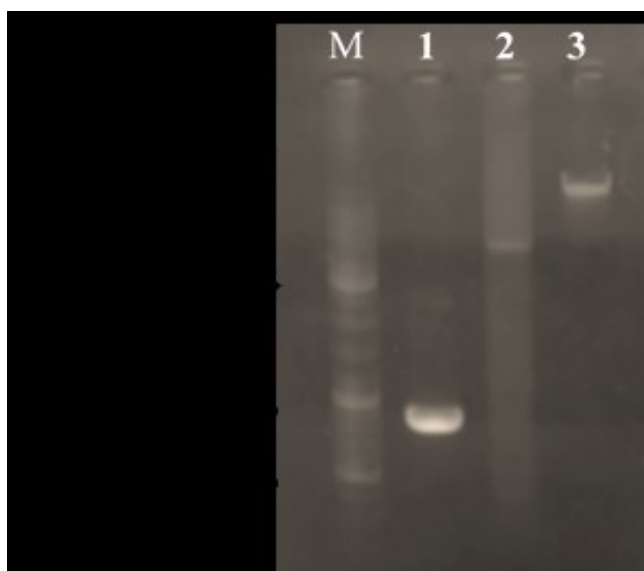
Материалы и методы исследования. В качестве основы для создания генетической конструкции использовался вектор pET42a(+) фирмы Invitrogen (США). Данную плазмиду линейаризовали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В представленном исследовании ген *hapA*, состоящий из 834 пар нуклеотидов, был выделен из штамма бактерии *E. coli* K-12 методом ПЦР. Встраивание этого гена в линейаризованную плазмиду производили методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [4]. Полученной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) методом электропорации с помощью прибора фирмы BioRad (США).

ПЦР-анализ полученных клонов-трансформантов визуализировали с помощью агарозного гель-электрофореза. Выделение плазмиды из клонов проводили с помощью коммерческого набора фирмы Jena Bioscience (Германия).

Результаты исследования. Плазмида и интересующий нас ген были амплифицированы с помощью ПЦР (рис. 1) и очищены при помощи коммерческого набора PCR Purification Kit (Jena Bioscience, Германия).

Встраивание гена в плазмиду проводили методом ПП-ПЦР. Данный метод основан на удлинении перекрывающейся области между вставкой и векторным фрагментом с образованием протяженной конкатамерной генетической конструкции.



М (здесь и далее) – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК.

Рис. 1 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов (1, 2, 3). 1 – ген *CharA*; 2 – линеаризованная плаزمида рЕТ42а(+); 3 – конструкция рЕТ42а-харА

При проведении ПП-ПЦР в реакционную смесь вносили 30 фемтомолей вектора и 30 фемтомолей гена *charA*. Для амплификации использовали следующую программу: этап предденатурации (30 с при 98 °С) – 15 циклов амплификации (5 с при 98 °С; 5 с при 66 °С; 3 мин при 72 °С) – финальная элонгация 3 мин при 72 °С.

Полученной смесью гена и плазмиды трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3). ДНК клонов подвергли ПЦР-скринингу для подтверждения наличия гена *charA* (рис. 2).

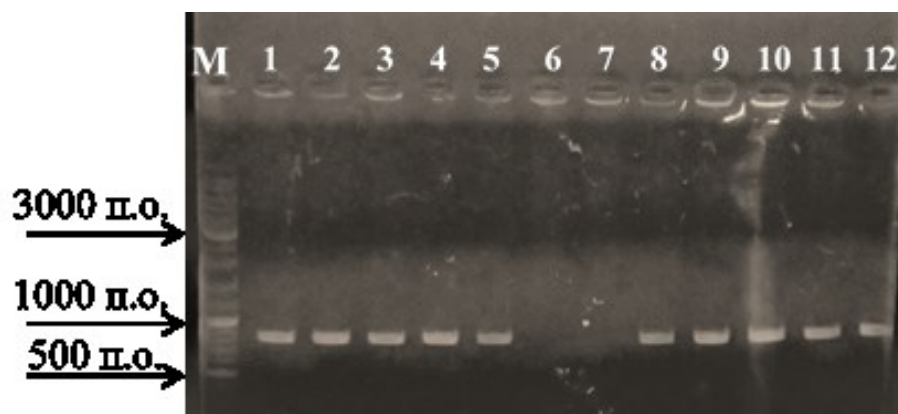


Рис. 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации гена *charA* в составе клонов-трансформантов (1–12)

Из электрофореграммы видно, что в образцах под номерами 1–5 и 8–12 находится исследуемый ген, который имеет ориентировочный размер 830 пар нуклеотидов.

Из клеток штамма-трансформанта под номером 10 выделили плазмиду путем щелочного лизиса [5]. Соответствующая электрофореграмма показала, что размер полученной плазмиды согласуется с теоретически рассчитанным – 5130 п.о.

Таким образом, в результате проведенной работы была создана генетическая конструкция рЕТ42а-харА, несущая ген *харА*.

В дальнейшей работе данная конструкция будет использована для создания рекомбинантного штамма *E. coli* – суперпродуцента гомологичной ксантозинфосфорилазы.

Литература:

1. Yoshino J., Baur J.A., Imai S. NAD⁺ intermediates: the biology and therapeutic potential of NMN and NR // Cell Metabol. – 2018. – Vol. 27, № 3. – P. 513–528.
2. Johnson S., Imai S.I. NAD⁺ biosynthesis, aging, and disease // F1000Res. – 2018. – Vol. 7. – Art. 132.
3. Dong W., Sun C., Zhu G., Hu S., Xiang L., Shao J. New function for *Escherichia coli* xanthosine phosphorylase (*xapA*): genetic and biochemical evidences on its participation in NAD⁺ salvage from nicotinamide // BMC Microbiol. – 2014. – Vol. 14, № 29. – P. 1471–2180.
4. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 7. – Art. e6441.
5. Green M.R., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Fourth edition / Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. – 2012. – 630 p.