

ШТАММ *BACILLUS SUBTILIS* ВКПМ В-10548 И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Сконструирован рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis*, несущий плазмиду с *luxAB*-генами грамотрицательного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi*, перед каждым из которых интродуцирован рибосом-связывающий сайт, характерный для грамположительных бактерий. Полученный штамм, характеризующийся высоким уровнем трансляции генов бактериальной люциферазы, депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под № В-10548. При оценке реакции *B. subtilis* ВКПМ В-10548 на воздействие сывороток крови различного компонентного состава показано соответствие подавления биолюминесценции уровню бактерицидного эффекта, преимущественно определяемому активностью бета-лизина.

Ключевые слова: биолюминесценция, *lux*-гены, *Bacillus subtilis*, бактерицидный эффект, бета-лизин.

Бактерицидные начала сыворотки крови являются одним из важных компонентов системы естественного врожденного иммунитета [1]. При этом уже на ранних этапах своего изучения они были принципиально разделены на два основных фактора: термолабильный «альфа-лизин» и термостабильный «бета-лизин». Позднее первый из них был идентифицирован как система комплекса, каскадная активация которого ведет к эффективному лизису грамотрицательных микроорганизмов [2], а второй, проявляющий наибольшую активность в отношении аэробных грамположительных спорообразующих микроорганизмов, стал все чаще ассоциироваться с катионными антимикробными пептидами тромбоцитарного происхождения [3].

Начиная с середины XX века, исследование активности бета-лизина в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека и животных стало распространенным подходом при решении вопросов дифференциальной диагностики, прогнозирования и контроля различных патологических и физиологических состояний [4]. При этом лабораторные методы качественного выявления и количественной оценки присутствия бета-лизина традиционно основывались на исследовании его ингибирующего влияния на жизнеспособность тестерных штаммов вида *Bacillus subtilis*, проявляющих наибольшую чувствительность к данному бактерицидному фактору [4, 5]. Однако, к настоящему моменту в силу своей значительной продолжительности и трудоемкости данные методы перестали соответствовать требованиям к современным лабораторным технологиям, что начало существенно огра-

ничивать их востребованность в современной медицине и ветеринарии.

Одним из возможных решений данного вопроса может стать использование в качестве объекта воздействия специальных генномодифицированных микроорганизмов с генами биолюминесценции – свечения, возникающего в ходе биохимических реакций, изменение интенсивности которого оказывается пропорциональным развивающемуся в подобных условиях бактерицидному эффекту [6]. Сказанное способно исключить необходимость дополнительного культивирования бактериальной биомассы после контакта с бактерицидными началами сыворотки крови, заменив его на количественную регистрацию интенсивности биолюминесценции тестерного штамма, что сообщает лабораторной технологии необходимую экспрессность, включая возможность оценки развития бактерицидного эффекта в режиме реального времени [7].

В этой связи целью настоящей работы явилось конструирование оригинального люминесцирующего штамма *Bacillus subtilis*, эффективно экспрессирующего гены бактериальной биолюминесценции, а также оценка возможности его использования для исследования бактерицидной активности сыворотки крови в сравнении с традиционным методом оценки присутствия бета-лизина в данной биологической жидкости.

При проведении работ в обозначенном направлении в качестве матрицы для получения фрагментов ДНК с генами бактериальной биолюминесценции использована плазида, содержащая полную кассету *lux*-генов природного морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium leiognathi*,

любезно предоставленная Е.А.Meighen (США) [8]. В свою очередь в качестве инструмента для клонирования данных генов использован Т-вектор на основе плазмиды *pTZ57R* (Fermentas, Литва), а также челночные плазмиды *pLF14* и *pLF22*, способные реплицироваться в широком круге хозяев.

Фрагменты ДНК, содержащие гены *luxA* и *luxB*, кодирующие альфа- и бета-субъединицы бактериальной люциферазы – ключевого фермента бактериальной биолюминесценции, были амплифицированы с использованием праймеров:

luxA
LuxADir 5' – GCGTCTCAGATCGGAAGGTGGGAAGAAATAATGAAAATTAGTAATATC – 3'
LuxARev 5' – GCGTCTCGACGTCATAGTTTAAAGAAACAGCTTACTGAGG – 3'

luxB
LuxBDir 5' – GCGTCTCGACGTCGAAGGTGGGAATAAAATATGAATTCGGGTTATTTTC – 3'
LuxBRev 5' – GCGTCTCCAATTGCCGTAATTAATAATTAATAAGGTTATC – 3'

важной особенностью которых являлось присутствие рибосом-связывающего сайта грамположительных бактерий (подчеркнут), последовательность которого взята из работы [9]. Кроме того, к 5' концам всех праймеров была добавлена последовательность сайта эндонуклеазы рестрикции *BsmBI* (помечена жирным шрифтом), обеспечивающая возможность последующего лигирования продуктов амплификации.

Очищенные при помощи элюции из геля фрагменты ДНК были рестрицированы и лигированы, после чего из полученной лигазной смеси амплифицированы фрагменты ДНК, содержащие искомые гены в последовательности *luxAB*. В свою очередь клонирование полученных ПЦР-продуктов в Т-векторе привело к созданию первичной плазмиды *pTZluxAB*, трансформация которой штамма *E. coli* MC1061 сообщила последнему способность к выраженной биолюминесценции при добавлении субстрата данной реакции – длинноцепочечного альдегида п-деканала.

С целью интеграции *luxAB*-генов в клетки *B. subtilis* они по сайтам *PstI* и *EcoRI* были переклонированы из *pTZluxAB* в челночные вектора *pLF14* и *pLF22*. При этом, несмотря на исходную предпочтительность использования последнего (меньший размер – 2,7 kb против 3,5 kb у *pLF14*, а также возможность транскрипции клонированных генов с более сильного промотора *PrepA*), созданная на его основе плазида *pLF22luxAB* характеризовалась сниженной копийностью и стабильностью, что могло объясняться проявлением т.н. «полярного» эффекта при клонировании значительного (более 2000 п.н.) фрагмента ДНК с генами *luxAB* между *repA* и *repB* генами репликона. В свою очередь перенос сформированной гибридной плазмиды *pLF14luxAB* в клетки *B. subtilis* 168 с последующим высевом бактериальной биомассы на LB-агар с 25 мкг/мл канамицина позволил получить рекомбинантный штамм *B. subtilis* 168 *pLF14luxAB* с высоким уровнем трансляции кон-

ститутивно транскрибируемых *luxAB*-генов, интенсивность свечения которого при добавлении п-деканала в концентрации 7×10^{-6} М. не менее чем в 10 раз превышала таковую у сконструированного ранее *B. subtilis* В-10191 с немодифицированными *luxAB*-генами *V. fischeri* [10].

Таким образом, первым результатом проведения настоящей работы стало создание рекомбинантного люминесцирующего штамма *B. subtilis*, несущего *luxAB*-гены морского микроорганизма *P. leiognathi*, перед каждым из которых интродуцирован рибосом-связывающий сайт, характерный для грамположительных бактерий, что обеспечивает достаточно высокий уровень трансляции конститутивно транскрибируемых генов бактериальной люциферазы. Данный штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика, Москва) под № В-10548.

Последующее исследование данного штамма включало оценку его реакции на воздействие 43 индивидуальных образцов сыворотки крови человека различного компонентного состава. При этом *B. subtilis* ВКПМ В-10548 выращивали в течение 48 часов на LB-агаре при 30 °С в присутствии селективного фактора (40 мкг/мл канамицина), смывали стерильным LB-бульоном и стандартизировали до оптической плотности 1,2 ед. при 540 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Полученную биомассу в соотношении 1:1 смешивали с исследуемыми образцами сыворотки крови или 0,85% раствора NaCl (контроль), после чего на 0 и 30 минутах инкубации при 37 °С из полученных смесей отбирали аликвоты по 250 мкл, в которые вносили по 2 мкл деканала. Регистрацию интенсивности свечения осуществляли на люминометре «Биотокс-7» (ООО «Нера», Россия). Параллельную оценку развития бактерицидного эффекта и количественного присутствия в исследуемых сыворотках крови бета-лизина проводили по методам [4, 7].

Полученные результаты позволили констатировать, что контакт *B. subtilis* ВКПМ В-10548 с использованными образцами сыворотки крови во всех случаях вел к выраженному подавлению уровня свечения, к 30-й минуте контакта переводящему его в относительно узкий диапазон 64,52 – 79,42 % от контрольных значений (рисунок 1А). В свою очередь параллельно оцененное бактериологическим методом количество клеток, сохранивших свою жизнеспособность при подобном воздействии, позволило зафиксировать сходное ассиметричное распределение результативного параметра, характеризующегося достоверным положительным коэффициентом корреляции ($r=0,372$; $P<0,05$) со значениями остаточной био-

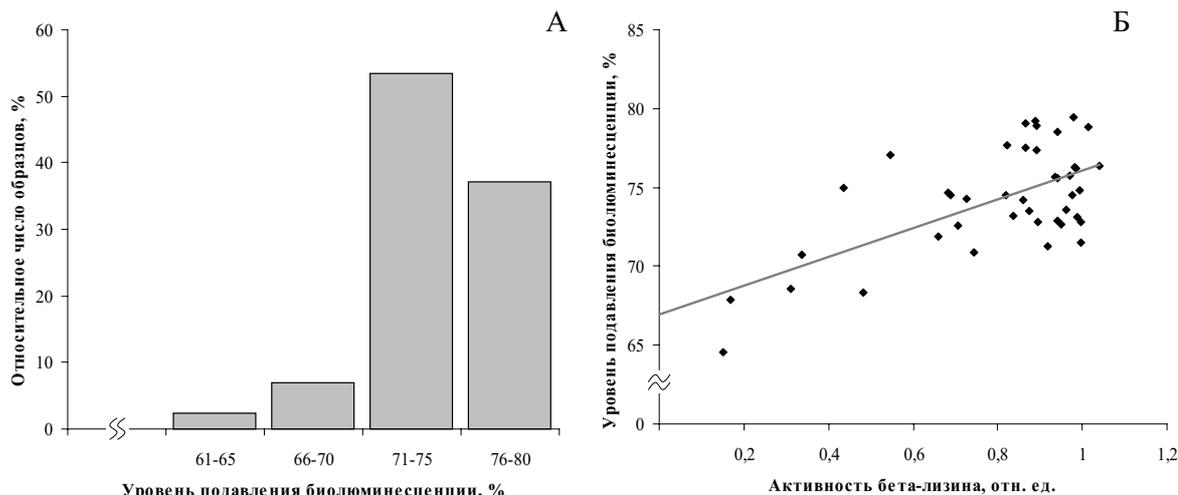


Рисунок 1. Частотное распределение величин подавления люминесценции *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10548 (А) и ее зависимость от активности бета-лизина в исследуемых образцах сыворотки крови (Б)

люминесценции. С другой стороны, интенсивность подавления свечения достоверно коррелировала ($r=0,481$; $P<0,01$) с количественным присутствием в 43 исследуемых сыворотках бета-лизина (рисунок 1Б), тем самым хорошо соответствуя представлениям о биологической активности названного фактора [4, 5].

Описанные особенности реактивности *B. subtilis* ВКПМ В-10548 определяют перспективу его включения в состав панели бактериальных люминесцирующих биосенсоров, ориентированных на оценку входящих в систему естественного врожденного иммунитета бактери-

цидных начал сыворотки крови, в том числе с акцентом на выявление активности бета-лизина. При этом единым принципом функционирования подобной диагностической панели должна стать количественная оценка подавления свечения бактериальных клеток-мишеней в присутствии исследуемой сыворотки крови, а требования к ее составу определяться наличием рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов, особенности строения поверхностных структур каждого из которых позволят относительно специфично оценивать состоятельность определенной бактерицидной системы.

14.11.11

Список литературы:

- Cooper, E. L. Comparative immunology [Текст] / E.L. Cooper // Curr. Pharm. Des. – 2003. – Vol. 9. – N 2. – P. 119–131.
- Dunkelberger, J.R. Complement and its role in innate and adaptive immune responses [Текст] / J.R. Dunkelberger, W.-C. Song // Cell Research. – 2010. – Vol. 20. – N 1. – P. 34–50.
- Бухарин, О.В. Свойства и функции тромбоцитарного катионного белка [Текст] / О.В. Бухарин, К.Г. Сулейманов // Успехи современной биологии. – 1998. – N 2. – С.194–204.
- Бухарин, О.В. Система бета-лизина и ее роль в клинической и экспериментальной медицине [Текст] / О.В. Бухарин, Н.В. Васильев // Томск, Изд-во ТГУ. – 1977. – 190 с.
- Саруханов, В.Я. Метод определения бета-литической активности крови сельскохозяйственных животных [Текст] / В.Я. Саруханов, Н.Н. Исамов, П.Г. Царин // Сельскохозяйственная биология. – 2007. – № 4. – С. 123–125.
- Дерябин, Д.Г. Причины, определяющие характер изменения бактериальной люминесценции при воздействии сыворотки крови [Текст] / Д.Г. Дерябин, Е.Г. Поляков // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – № 2. – С. 191–197.
- Дерябин, Д.Г. Определение бактерицидной активности сыворотки крови в режиме реального времени с использованием рекомбинантных люминесцирующих бактерий [Текст] / Д.Г. Дерябин, Е.Г. Поляков // Бюлл. экспериментальной биол. и мед. – 2006. – N 8. – С.200–204.
- Lee, C.Y.
- The lux genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. Nucleotide sequence, difference in gene organization, and high expression in mutant *Escherichia coli* [Текст] / C.Y. Lee, R.B. Szittner, E.A. Meighen // Eur. J. Biochem. – 1991. – Vol.201. – N 1. – P. 161–167.
- Francis, K.P. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel *luxABCDE* construct [Текст] / K.P. Francis, D. Joh, C. Bellinger-Kawahara, M.J. Hawkinson, T.F. Purchio, P.R. Contag // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68. – N 6. – P. 3594–3600.
- Каримов, И.Ф. Особенности люминесцентного отклика рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* с клонированными *luxAB*-генами *Vibrio fischeri* при воздействии термостабильных компонентов сыворотки крови [Текст] / И.Ф. Каримов, И.В. Манухов, В.Ю. Котова, Д.О. Омельченко, Д.Г. Дерябин // Биотехнология. – 2010. – №2 – С.25–30.

**Исследования выполнены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы
«Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы
(контракт № П327) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований
(проект № 11-04-97064-р_поволжье_а)**

Сведения об авторе: **Каримов Ильшат Файзелгаянович**, доцент кафедры микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, e-mail: ifkarimov@yandex.ru
Оренбург, пр. Победы, д. 13, корп. 16, ауд. 306

Манухов Илья Владимирович, ведущий научный сотрудник ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», доктор биологических наук, e-mail: manukhov@genetika.ru
Москва, 1-ый Дорожный пр-д., д. 1, ком. 3302

Иванов Юрий Борисович, председатель Областной общественной организации «Ассоциация молодых ученых и специалистов», кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, e-mail: ubi@mail.orb.ru
Оренбург, ул. Пионерская, д. 11, ком. 305

Дерябин Дмитрий Геннадьевич, заведующий кафедрой микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, доктор медицинских наук, профессор, e-mail: dgderyabin@yandex.ru
Оренбург, пр. Победы, д. 13, корп. 16, ауд. 209

UDC 579.61; 571.27; 57.083

Karimov I.F.¹, Manukhov I.V.², Ivanov Y.B., Deryabin D.G.¹

¹Orenburg State University; ²Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, e-mail: dgderyabin@yandex.ru

BACILLUS SUBTILIS VKPM V-10548 STRAIN AND IT APPLICATION FOR SERUM BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY RESEARCH

The recombinant *Bacillus subtilis* strain carrying plasmid with gram-negative sea microorganism *Photobacterium leiognathi* luxAB genes, before each introduced gram-positive bacteria ribosome-binding site is designed. This strain characterized by high gene expression level of bacterial luciferase and was deposited in the Russian National Collection of Industrial Microorganisms under № V-10548. In researching of *B. subtilis* VKPM V-10548 reaction in contact with different component serum blood probes the correspondence between bioluminescence suppression and bactericidal effect level mainly determined by beta-lysine activity is shown.

Key words: bioluminescence, lux-genes, *Bacillus subtilis*, bactericidal effect, beta-lysine

References:

- Cooper, E. L. Comparative immunology [Text] / E.L. Cooper // Curr. Pharm. Des. – 2003. – Vol. 9. – N 2. – P. 119–131.
- Dunkelberger, J.R. Complement and its role in innate and adaptive immune responses [Text] / J.R. Dunkelberger, W.-C. Song // Cell Research. – 2010. – Vol. 20. – N 1. – P. 34–50.
- Bukharin, O.V. Property and functions of platelet cationic protein [Text] / O.V. Bukharin, K.G. Suleymanov // Progress of modern biology. – 1998. – N 2. – P. 194–204.
- Bukharin, O.V. System of beta-lysine and its role in clinical and experimental medicine [Text] / O.V. Bukharin, N.V. Vasilyev // Tomsk, Publisher TSU. – 1977. – 190 p.
- Sarukhanov, V.Ya. Method of detection beta-lysine activity of agricultural animals blood [Text] / V.Ya. Sarukhanov, N.N. Isamov, P.G. Carin // Agricultural biology. – 2007. – N 4. – P. 123–125.
- Deryabin, D.G. Causes determining character of bacterial luminescence changing on serum blood influence [Text] / D.G. Deryabin, E.G. Polyakov // Microbiology. – 2005. – Vol. 74. – N 2. – P. 191–197.
- Deryabin, D.G. On-line determination of serum bactericidal activity using recombinant luminescent bacteria [Text] / D.G. Deryabin, E.G. Polyakov // Bulletin of experimental biology and medicine – 2006. – N 8. – P. 200–204.
- Lee, C.Y.
- The lux genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. Nucleotide sequence, difference in gene organization, and high expression in mutant *Escherichia coli* [Text] / C.Y. Lee, R.B. Szittner, E.A. Meighen // Eur. J. Biochem. – 1991. – Vol. 201. – N 1. – P. 161–167.
- Francis, K.P. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct [Text] / K.P. Francis, D. Joh, C. Bellinger-Kawahara, M.J. Hawkinson, T.F. Purchio, P.R. Contag // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68. – N 6. – P. 3594–3600.
- Karimov, I.F. Peculiarities of luminescent response of *Bacillus subtilis* recombinant strain bearing cloned *Vibrio harveyi* lux AB genes to the action of thermostable blood serum compounds [Text] / I.F. Karimov, I.V. Manukhov, V.Yu. Kotova, D.O. Omel'chenko, D.G. Deryabin // Biotechnology. – 2010. – N 2 – P. 25–30.