ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.29
https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-319-327

Поступила в редакцию 06.04.2020
Received 06.04.2020

Е. В. Кулик, Ю. В. Селезнева, А. В. Качан, О. Б. Русь, А. Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

КЛОНИРОВАНИЕ кДНК ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *ASPERGILLUS AWAMORI* В ИНТЕГРАТИВНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ МЕТОДОМ КОЛЬЦЕВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ

Аннотация. С использованием метода кольцевой полимеразной реакции (circular polymerase extension cloning, CPEC) было проведено успешное клонирование кДНК гена глюкоамилазы *Aspergillus awamori* в интегративный вектор для мицелиальных грибов pH4Hyg. Вначале были проведены две полимеразные цепные реакции (ПЦР). В результате первой амплифицирована кДНК гена *glaA*, ранее клонированная в плазмиду на основе вектора pBluescript II SK(–), в результате второй – вектор pH4Hyg в линейной форме, содержащий промотор и терминатор целевого гена. Полученные ампликоны были очищены от компонентов смеси ПЦР. После 20 циклов реакции CPEC была синтезирована конечная генетическая конструкция pH4HygPTgla, которая может использоваться в создании штаммов мицелиальных грибов, секретирующих глюкоамилазу в стабильной конформации, обладающую биотехнологически значимыми свойствами.

Ключевые слова: клонирование методом кольцевой полимеразной реакции (CPEC), глюкоамилаза, *Aspergillus awamori*, интегративный вектор

Для цитирования: Клонирование кДНК глюкоамилазы *Aspergillus awamori* в интегративный вектор для мицелиальных грибов методом кольцевой полимеразной реакции / Е. В. Кулик [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 319–327. https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-319-327

Alena V. Kulik, Yuliya V. Selezneva, Alexandr V. Kachan, Olga B. Rus, Anatoliy N. Evtushenkov

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING OF cDNA GLUCOAMYLASE *ASPERGILLUS AWAMORI* INTO INTEGRATIVE VECTOR FOR FILAMENTOUS FUNGI

Abstract. This article describes successful insertion the cDNA glucoamylase from *Aspergillus awamori* into the integrative vector for filamentous fungi pH4Hyg using the CPEC (circular polymerase extension cloning) strategy. The prior step was the PCR amplification of the cDNA *glaA* gene cloned into a vector based on the plasmid pBluescript II SK(–) and the amplification of linear pH4Hyg vector with promotor and terminator of the *glaA* gene. The PCR products were purified and used for CPEC reaction. The CPEC product was formed after 20 cycles of the reaction. It is proposed to use the final plasmid pH4HygPTgla in engineering of filamentous fungi strains producing stable forms of glucoamylase with biotechnological interest.

Keywords: circular polymerase extension cloning (CPEC), glucoamylase, *Aspergillus awamori*, integrative vector

For citation: Kulik A. V., Selezneva Yu. V., Kachan A. V., Rus O. B., Evtushenkov A. N. Circular polymerase extension cloning of cDNA glucoamylase *Aspergillus awamori* into integrative vector for filamentous fungi. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 319–327 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-319-327

Введение. В различных отраслях пищевой промышленности, таких как спиртовая, пивоваренная, крахмалопаточная и хлебопекарная, широко используются препараты глюкоамилазы для ферментативной обработки крахмалсодержащего сырья. Глюкоамилаза (α-1,4-глюкан-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.3) – это экзодеполимераза, относящаяся к семейству GH15 гликозидгидролаз [1, 2]. Она последовательно отщепляет остатки глюкозы от нередуцирующего конца молекул крахмала или мальтоолигосахаридов. Кроме α-1,4-гликозидных связей фермент медленно гидролизует α-1,6-гликозидные связи, расщепляя крахмалсодержащее сырье до β-D-глюкозы. При высокой концентрации глюкозы в реакционной среде глюкоамилазы могут катализировать реакцию транс-гликозилирования с образованием мальтозы, изомальтозы и других продуктов [3].

Основными продуцентами глюкоамилаз являются эукариотические организмы – плесневые грибы и дрожжи. Согласно современной классификации, выделяют 7 подсемейств глюкоамилаз,

в 4 из которых входят ферменты грибов [4, 5]. Среди плесневых грибов фермент синтезируют представители рода *Aspergillus* видов *awamori*, *niger*, *oryzae*, *terreus* и др., рода *Rhizopus* видов *oryzae*, *niveus*, *delemar*, а также родов *Neurospora*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др. [4]. В дрожжах глюкоамилаза обнаружена у таких видов, как *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, *Pichia subpelliculosa* и др.

Использование ферментных препаратов глюкоамилазы в промышленных масштабах обусловливает необходимость наличия ряда технологически значимых биохимических свойств, что будет способствовать повышению рентабельности производственного процесса и снижению стоимости конечного продукта. Например, использование термостабильной глюкоамилазы грибного происхождения на втором этапе процесса осахаривания крахмалсодержащего сырья в производстве этанола позволит снизить расход электроэнергии и воды на охлаждение промежуточного продукта.

С целью получения фермента с определенными характеристиками используют различные молекулярно-генетические стратегии, для реализации которых необходимы простые, эффективные, точные и экономичные методы. Молекулярное клонирование – это одна из значимых стадий в процессе создания белковых препаратов с заданными свойствами. Стандартный способ клонирования целевых генов в плазмидные векторы основан на использовании рестрицирующих эндонуклеаз и ДНК-лигазы. Однако этот подход имеет ряд ограничений: дополнительное применение наряду с рестриктазами и ДНК-лигазами других ферментных систем и реагентов; во избежание нарушения генетической целостности в процессе рестрикции следует учитывать особенности нуклеотидной последовательности объединяемых молекул. Кроме того, этот способ может быть неэффективным в случае клонирования фрагментов большого размера.

Альтернативой являются методы клонирования, применение которых не требует использования реакций рестрикции, а часто и лигирования. Одним из методов такого рода является так называемая сборка Гибсона (Gibson assembly) [6], успешно примененная сотрудниками Института Крейга Вентера для соединения синтезированных химическим способом полинуклеотидных последовательностей на одном из этапов создания синтетического генома *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 [7]. Условием успешного получения рекомбинантных молекул этим методом является то, что соединяемые концы линейных двунитевых ДНК должны иметь одинаковые последовательности длиной 20–40 п. н. С помощью обработки молекул ДНК 5′-3′-экзонуклеазой на концах фрагментов создаются протяженные одноцепочечные участки, способные к комплементарному взаимодействию. Образование ковалентных связей между комплементарно связанными молекулами осуществляется путем внесения в реакционную смесь ДНК-зависимой ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. Процедура позволяет за 1 ч реакции в одной пробирке соединить до 5 фрагментов ДНК в строго определенном порядке и ориентации.

Модификацией данного метода является технология LIC (ligation-independent cloning), которая позволяет получать с помощью экзонуклеазы однонитевые выступающие концы строго контролируемой длины [8]. Соединяемые фрагменты ДНК на 3′-концах, которые необходимо укоротить для получения выступающих 5′-концов, должны иметь одинаковые последовательности размером 20 п. н., состоящие лишь из трех видов нуклеотидов. Реакция проводится в присутствии ДНК-полимеразы фага T4 и четвертого вида дНТФ. При недостатке нуклеотидов ДНК-полимераза функционирует как 3′–5′-экзонуклеаза, укорачивая 3′-концы. Наличие в гидролизуемой последовательности добавленного в реакцию дНТФ подавляет экзонуклеазную активность, что позволяет получить 5′-выступающий конец строго определенной длины.

Для объединения фрагментов ДНК активно используются ферменты гомологичной и сайт-специфической рекомбинации. Метод рекомбинационной инженерии с использованием продуктов оперона Red бактериофага λ или белков RecET профага rac *E. coli* может быть использован не только для осуществления вставок в хромосомную ДНК бактерий [9], но и для встраивания продуктов ПЦР в векторную молекулу *in vivo* [10]. Вектором в линейном виде вместе с продуктами амплификации котрансформируют клетки бактерий. При наличии на концах продукта ПЦР 30-нуклеотидных последовательностей, гомологичных двум участкам в векторной молекуле, белки гомологичной рекомбинации обеспечивают встраивание целевого фрагмента в вектор.

Для высокоэффективного субклонирования участка ДНК из какой-либо донорной векторной молекулы в набор разнообразных векторов-мишеней может быть успешно применена система клонирования GATEWAY, разработанная Invitrogen life technologies [11]. Данная система использует белки сайт-специфической рекомбинации бактериофага λ. Для обеспечения взаимодействия рекомбиназ с ДНК и последующего формирования продуктов рекомбинации участки, фланкирующие клонируемый фрагмент, и места встраивания в молекулах-мишенях содержат сайты *attP* и *attB* или их модифицированные варианты.

Среди существующих методов клонирования без использования рестриктаз и ДНК-лигазы следует отметить метод CPEC (circular polymerase extension cloning), разработанный J. Quan и J. Tian [12]. Это высокоэффективный одноэтапный метод клонирования, основанный на использовании кольцевой полимеразной реакции. Поскольку CPEC, в отличие от ПЦР, не является амплификационным процессом, то в синтезируемом конечном продукте мутации не накапливаются. Для проведения реакции необходимы двухцепочечные линейные ДНК вектора и вставки, фланкированные на обоих концах перекрывающимися комплементарными гомологичными участками длиной 15–25 нуклеотидов, которые, аналогично праймерам при ПЦР, будут служить затравками для ДНК-полимеразы. Температура плавления таких перекрывающихся участков должна быть в диапазоне от 60 до 70 °С. Для проведения реакции используют ДНК-полимеразы с высокой точностью полимеризации и соответствующие наборы реактивов. В типичной реакции CPEC линейные двухцепочечные ДНК вставки и вектора смешивают и денатурируют путем нагревания. При понижении температуры одноцепочечные молекулы ДНК отжигаются перекрывающимися участками с образованием кольцевых структур и далее в процессе полимеразной реакции достраиваются ДНК-полимеразой до рекомбинантной двухцепочечной кольцевой плазмиды. Обычно необходимо 15–18 циклов. В результате реакции образуются двухцепочечные кольцевые плазмиды с одним «ником» в каждой цепи, которые можно использовать для трансформации компетентных клеток бактерий. Разработчики метода CPEC экспериментально подтвердили эффективность предложенного способа на примере клонирования как отдельного гена *lacZα* в вектор pUC19, так и кодонных вариантов этого гена для создания генетической библиотеки.

Цель данной работы – используя метод кольцевой полимеразной реакции, провести субклонирование последовательности кДНК гена глюкоамилазы *Aspergillus awamori* из конструкции pBGLA-1, созданной на основе вектора pBluescript II SK(–), в интегративный вектор для мицелиальных грибов pH4Hyg с образованием плазмиды, содержащей ген *gla*A под собственным промотором. С помощью такой генетической конструкции можно осуществлять встраивание целевого гена с различными модификациями в геномную ДНК гриба, что открывает перспективы для получения штаммов *A. awamori*, синтезирующих и секретирующих глюкоамилазу с определенными промышленно значимыми характеристиками.

Объекты и методы исследования. Для амплификации кДНК, находящейся в составе вектора pBGLA-1 (50–250 нг), использовали смесь ферментов Taq-Pfu High Fidelity и соответствующий буфер ОДО «Праймтех», 0,2 ммоль/л дНТФ, праймеры glaf и glar в концентрации 0,5 мкмоль/л каждый. Режим амплификации: предварительная денатурация – при 96 °С 2 мин (30 циклов): денатурация – при 94 °С 10 с, отжиг праймеров – при 62 °С 30 с, элонгация – при 72 °С 2 мин; финальная элонгация – при 72 °С 7 мин. Синтезированный ПЦР-продукт выделяли из геля и очищали с помощью набора реактивов Agarose Gel Extraction Kit фирмы Jena Bioscience в соответствии с рекомендациями производителя.

Синтез интегративного вектора для мицелиальных грибов в виде линейной структуры, содержащей промотор и терминатор целевого гена глюкоамилазы без кодирующей последовательности, осуществляли с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pH4HygglaA (50–250 нг), праймеров glaAbf и glaAbr в концентрации 0,5 мкмоль/л каждый, 0,2 ммоль/л дНТФ, фермента Diamant Pfu DNA-Polymerase и соответствующей буферной системы. Режим амплификации: предварительная денатурация – при 98 °С 30 с (30 циклов): денатурация – при 98 °С 10 с, отжиг праймеров – при 70 °С 30 с, элонгация – при 72 °С 4 мин; финальная элонгация – при 72 °С 5 мин. Синтезированный линейный ампликон вектора очищали от компонентов реакционной смеси путем переосаждения с использованием полиэтиленгликоля. Для этого

в ПЦР-смесь вносили раствор 5 моль/л NaCl до конечной концентрации 0,1 моль/л и 2,2 объема охлажденного 96 %-ного этанола. Смесь выдерживали при температуре –20 °С в течение 30 мин. ДНК осаждали путем центрифугирования при 12 000 об/мин, 4 °С, 10 мин. Осадок растворяли в 32 мкл воды (milli-Q), добавляли 8 мкл раствора 5 моль/л NaCl, 40 мкл 22 %-ного водного раствора полиэтиленгликоля-6000 и перемешивали. После инкубации на ледяной бане в течение 20 мин проводили центрифугирование при 12 000 об/мин, 4 °С, 5–10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в 20 мкл раствора ацетата натрия (0,3 моль/л), добавляли 2,5 объема 96 %-ного этанола, перемешивали, выдерживали на ледяной бане 15 мин. После центрифугирования (12 000 об/мин 15 мин) и удаления супернатанта в пробирки вносили 250 мкл 70 %-ного этанола и центрифугировали при 12 000 об/мин 5 мин. Полученные осадки высушивали, затем ресуспендировали в 20 мкл деионизированной воды, хранили при температуре –20 °С.

Электрофоретическое разделение ампликонов проводили в 0,8 %-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере с добавлением бромистого этидия в камере для горизонтального электрофореза фирмы BioRad. Их визуализацию осуществляли с помощью трансиллюминатора.

Клонирование кДНК в синтезированный линейный интегративный вектор проводили с помощью кольцевой полимеразной реакции. Реакционная смесь объемом 60 мкл состояла из следующих компонентов: 24 мкл 2,5×буфера для Diamant Pfu полимеразы, 3 мкл 100 нг/мкл ПЦР-продукта кДНК, 3 мкл 100 нг/мкл ПЦР-продукта вектора, 0,6 мкл фермента Diamant Pfu полимеразы, 29,4 мкл дистиллированной воды. Температурный профиль реакции: предварительная денатурация – при 98 °С 30 с (20 циклов): денатурация – при 98 °С 10 с, отжиг – при 70 °С 30 с, элонгация – при 72 °С 5 мин; финальная элонгация – при 72 °С 7 мин.

Для введения созданной генетической конструкции в клетки *Escherichia coli* XL1-Blue использовали метод электропорации. Для этого ночную культуру бактерий разводили в соотношении 1:25 свежим LB-бульоном и выращивали в условиях аэрации (180 об/мин) при 37 °С до достижения оптической плотности ($ОП_{600}$), равной 0,4–0,6. Суспензию бактерий переносили в центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане в течение 15 мин. Клетки осаждали путем центрифугирования при 6000 об/мин, 4 °С, 3 мин. Осадок бактерий ресуспендировали в половине исходного объема дистиллированной воды, охлажденной до 4 °С, клетки концентрировали с помощью центрифугирования при 6000 об/мин, 4 °С, 3 мин. Процедуру отмывания клеток повторяли дважды, в каждом последующем случае вдвое уменьшая объем воды. Клетки ресуспендировали в примерно равном объему осадка количестве охлажденного 15 %-ного раствора глицерина в воде, замораживали при температуре –70 °С. Электропорацию проводили с помощью прибора MicroPulser фирмы Bio-Rad. При работе использовали электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 1 или 2 мм. К суспензии компетентных клеток в объеме 20 мкл (при использовании кюветы 1 мм) или 40 мкл (при использовании кюветы 2 мм) добавляли реакционную смесь после проведения СРЕС, перемешивали и вносили в предварительно охлажденную кювету. Последнюю помещали в электропоратор и подавали импульс тока с соответствующим кювете напряжением. После подачи импульса кювету извлекали и добавляли к клеткам 1 мл LB-бульона, содержащего 0,2 % глюкозы. Клетки инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем высевали на LB-агар с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл среды.

Для препаративного ПЦР-анализа клонов использовали два типа ПЦР-реакций. При первом типе применяли пару праймеров – glaA1f и glaA1r, при втором – glaAf и glaAr. В обоих случаях реакционная смесь объемом 15 мкл включала следующие компоненты: 1×буфер АМ фирмы «Праймтех», 0,2 ммоль/л дНТФ, 0,5 мкмоль/л каждого из праймеров, 0,025 Ед/мкл Taq полимеразы. Режим амплификации: предварительная денатурация – при 94 °С 5 мин (30 циклов): денатурация – при 94 °С 30 с, отжиг праймеров – при 61 °С 30 с, элонгация – при 72 °С 5 мин; финальная элонгация – при 72 °С 10 мин.

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех», их нуклеотидная последовательность представлена в таблице.

Результаты и их обсуждение. Глюкоамилаза является широко востребованным в промышленности ферментом, используемым для обработки крахмалсодержащего сырья. Применение мицелиальных грибов в качестве продуцентов глюкоамилазы с определенными свойствами

Нуклеотидная последовательность прямых (f) и обратных (r) праймеров

The nucleotide sequence of forward (f) and reverse (r) primers

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5′–3′
glaf	GCGACCTTGGATTCGTGGTTGAGCAACGAAGCG
glar	CTACCGCCAGGTGTCAGTCACCGTCGCG
glaAbf	CGCTTCGTTGCTCAACCACGAATCCAAGGTCGC
glaAbr	CGCGACGGTGACTGACACCTGGCGGTAG
glaA1f	CCGGATCCGGAGAATCAGCAGGAGCCATT
glaA1r	CCGGATCCGAGCCGATCAGACCAGTAGGT
glaAf	CCCCTCGAGAAAAGAGCGACCTTGGATTCGTGGTTGAG
glaAr	CCCGAATTCCTACCGCCAGGTGTCAGTCACC

открывает перспективы существенного повышения эффективности технологического процесса. Создание таких продуцентов, обладающих способностью стабильно наследовать модифицированный ген *glaA*, синтезировать и секретировать кодируемый им фермент, стало возможным благодаря современным молекулярно-генетическим стратегиям, основанным на использовании интегративных векторов, которые позволяют встроить в грибной геном целевой ген.

В данной работе для создания интегративного вектора для мицелиальных грибов с кДНК *A. awamori* в качестве исходных были использованы две ранее сконструированные плазмиды – pBGLA-1 и pH4HygglaA. Генетическая конструкция pBGLA-1, содержащая кДНК, была получена на основе вектора pBluescript II SK(–). Ее небольшой размер позволяет быстро проводить сайт-направленный мутагенез с целью введения точечных нуклеотидных замен, которые придадут ферменту определенные свойства. Плазмида pH4HygglaA, сконструированная на основе вектора pH4Hyg, имеет в составе полноразмерный ген *glaA* с промоторным и терминаторным участками. С целью замещения целевого гена на его кДНК вариант без использования рестриктаз и ДНК-лигазы среди различных методов был выбран высокоэффективный способ, основанный на применении кольцевой полимеразной реакции. Для реализации этой реакции необходимы ампликоны вставки и вектора, фланкированные на обоих концах перекрывающимися комплементарными участками. С целью получения таких ПЦР-продуктов были сконструированы две пары праймеров (glaf, glar и glaAbf, glaAbr), с помощью которых синтезировали фрагменты вставки и вектора, соответствующие указанным выше требованиям.

В результате реакции амплификации с использованием пары праймеров glaf, glar и в качестве матрицы плазмиды pBGLA-1 получен ампликон кДНК размером около 1800 п. н. (рис. 1). ПЦР-продукт был очищен от компонентов реакционной среды с помощью коммерческого набора реактивов Agarose Gel Extraction Kit фирмы Jena Bioscience согласно рекомендациям производителя.

Интегративный вектор для мицелиальных грибов с полноразмерным геном глюкоамилазы pH4HygglaA являлся матрицей в реакции амплификации, в результате которой синтезировался его линейный вариант с промотором и терминатором целевого гена без кодирующей последовательности. ПЦР осуществляли с использованием праймеров glaAbf и glaAbr, фермента Diamant Pfu DNA-Polymerase и соответствующей буферной системы. Поскольку эффективность реакции была низкой и количество синтезированного ампликона являлось недостаточным для осуществления последующего субклонирования, проводили тестирование градиента температуры отжига праймеров в пределах от 66 до 72 °С. В результате оптимизации условий ПЦР было установлено, что в данной реакционной системе наибольшее

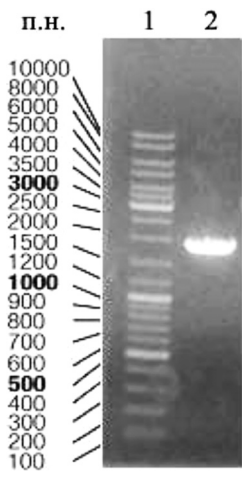


Рис. 1. Электрофореграмма ампликона, полученного с использованием плазмидной ДНК pBGLA-1 и специфических праймеров к кДНК гена *glaA A. awamori. 1* – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific), *2* – амплифицированная кДНК глюкоамилазы

Fig. 1. Agarose electrophoresis of PCR amplicon obtained by PCR with plasmid DNA pBGLA-1 and gene-specific primers for cDNA *glaA* gene from *A. awamori. 1* – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific), *2* – amplified cDNA glucoamylase

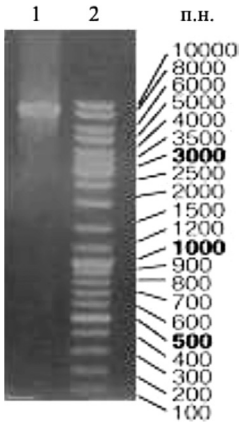


Рис. 2. Электрофореграмма ампликона вектора pH4Hyg в линейной форме с промотором и терминатором гена *glaA A. awamori*. Ампликон получен с использованием плазмиды pH4HygglaA, праймеров glabf и glabr. *1* – ПЦР-продукт, *2* – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

Fig. 2. Amplification of linear pH4Hyg vector with promotor and terminator of the *glaA* gene from *A. awamori.* Amplicon was obtained with the pH4HygglaA plasmid, glabf and glabr primers. *1* – PCR product, *2* – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

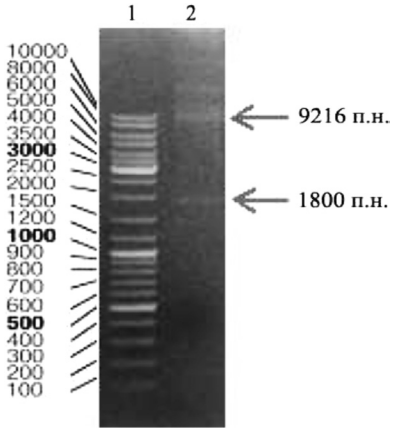
количество продукта синтезируется при температуре отжига праймеров 70 °С. С целью подтверждения образования ампликона ожидаемого размера 7400 п. н. было проведено электрофоретическое разделение ПЦР-продукта (рис. 2). Для выделения из геля и очистки ампликона вектора использовали полиэтиленгликоль.

Как показал обзор литературных данных, где представлены преимущества применения метода СРЕС, для получения конечной генетической конструкции в каждом конкретном случае требуется подбор условий реакции, таких как количество циклов реакции, молярное соотношение вектора и вставки, тип полимеразы, буферные системы и др. [12–14].

В данной работе в результате оптимизации реакции СРЕС линейные ПЦР-продукты вектора и кДНК были разбавлены до концентрации 100 нг/мкл. С помощью ферментной системы Diamant Pfu DNA-Polymerase после 20 циклов реакции удалось объединить молекулы вектора и вставки с образованием конечной генетической конструкции ожидаемого размера – 9216 п. н. (рис. 3).

Введение созданной плазмиды в клетки бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue осуществляли методом электропорации с использованием СРЕС-смеси после проведения объединяющей реакции. Трансформанты высевали на LB-агар с добавлением в качестве селективного агента ампициллина в концентрации 100 мкг/мл. Полученные клоны анализировали с помощью двух типов препаративной ПЦР, в которых матрицей являлись плазмидные ДНК колоний бактерий. В случае эффективного субклонирования в составе вектора pH4HygglaA в гене глюкоамилазы кодирующая последовательность полноразмерного гена с интронами была заменена на кДНК, при этом участки промотора и терминатора остались от исходного гена. Следует отметить, что среди трансформантов могли быть варианты с векторами pH4HygglaA и pBGLA-1, поскольку некоторое количество их ДНК остается в ПЦР-продуктах после очистки и попадает в реакционную смесь СРЕС. Однако при использовании праймеров к промотору и терминатору гена глюкоамилазы (glaA1f и glaA1r), а также в качестве матрицы конструкции pBGLA-1 ПЦР-продукт не синтезируется, поскольку эта плазмида содержит только кДНК целевого гена. В случае использования вектора pH4HygglaA ампликон будет образовываться так же, как и при эффективно объединенной конструкции, однако размер его будет больше в связи с наличием интронов в гене.

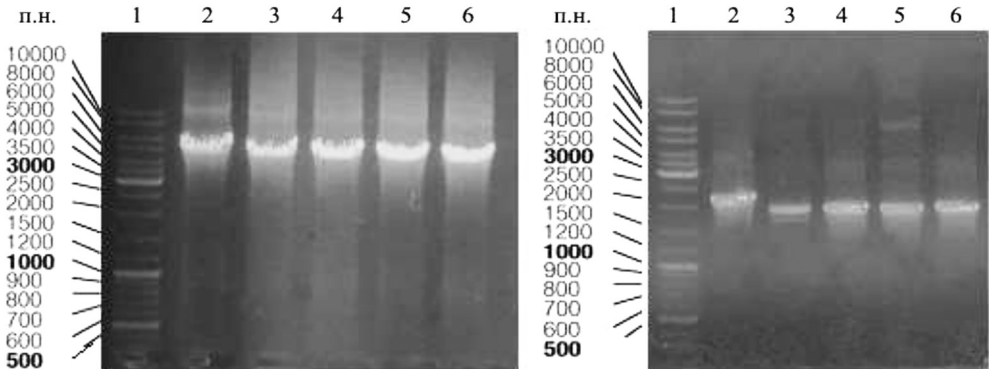
В другом типе ПЦР с праймерами glaAf и glaAr, с помощью которых амплифицируется как полноразмерный ген *glaA*, так и кДНК, отличить конечную генетическую конструкцию pH4HygPTgla от исходного варианта pH4HygglaA можно по размеру ПЦР-продукта, который будет на 257 п. н. меньше, что соответствует интронной области гена.



В результате проведенных ПЦР с двумя типами пар праймеров, как продемонстрировано на электрофореграммах рис. 4, выявлена ожидаемая разница в размерах ампликонов, полученных с использованием исходного вектора pH4HygglaA, и конструкции,

Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов реакции СРЕС после 20 циклов. *1* – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific); *2* – размер плазмиды pH4HygPTgla, синтезированной в результате реакции, составил 9216 п. н., фрагмент размером 1800 п. н. соответствует не встроенному в вектор ампликону кДНК гена *glaA*

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis of the CPEC reaction product after 20 cycles of the reaction. *1* – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific), *2* – the assembled full-length pH4HygPTgla plasmid is 9216 bp, the 1800 bp band is free PCR product of the cDNA *glaA* gene



A *B*

Рис. 4. Элекрофоретический анализ ампликонов, полученных с использованием колоний трансформантов *E. coli* XL1-Blue, на присутствие в клетках сконструированной с помощью стратегии CPEC плазмиды pH4HygPTgla, содержащей кДНК гена *glaA*. ПЦР-продукты получены с использованием праймеров glaA1f, glaA1r (*A*), glaAf, glaAr (*B*), плазмиды pH4HygglaA (*2*), колоний (*3–6*). *1* – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

Fig. 4. Gel electrophoresis analysis of the cDNA *glaA* insert amplified from independent colonies *E. coli* XL1-Blue with the pH4HygPTgla plasmid constructed using the CPEC strategy. PCR amplicons were obtained with primers glaA1f, glaA1r (*A*), glaAf, glaAr (*B*), plasmid pH4HygglaA (*2*), colonies (*3–6*). *1* – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

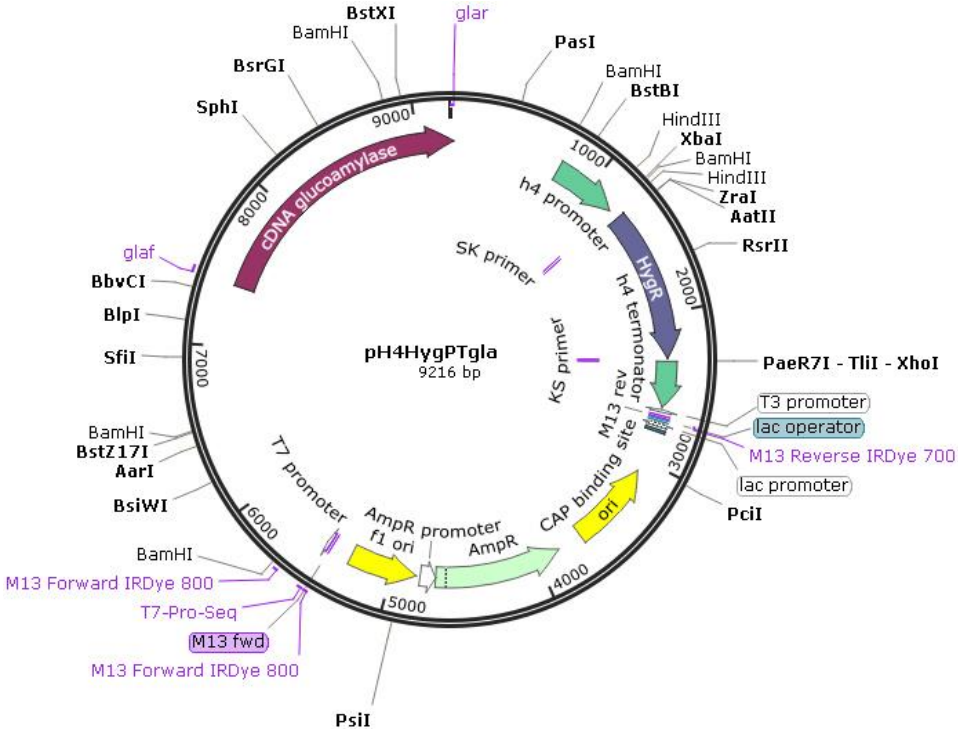


Рис. 5. Генетическая карта плазмиды pH4HygPTgla

Fig. 5. Genetic map of the pH4HygPTgla plasmid

объединенной в реакции CPEC, которая находилась в бактериальных клетках анализируемых клонов. Эти данные указывают на успешное клонирование кДНК в интегративный вектор. Впоследствии из клеток трансформантов, в которых подтверждено наличие сконструированной плазмиды, осуществляли выделение последней.

С помощью программы SnapGene была построена генетическая карта созданной плазмиды pH4HygPTgla (рис. 5).

Заключение. С использованием метода кольцевой полимеразной реакции создана генетическая конструкция pH4HygPTgla на основе интегративного вектора для мицелиальных грибов

pH4HygglaA, в котором кодирующая последовательность полноразмерного гена глюкоамилазы *A. awamori* с интронами заменена на кДНК, при этом участки промотора и терминатора остались от исходного целевого гена. Полученная плазмидная ДНК может найти применение при создании штаммов *A. awamori*, синтезирующих и секретирующих глюкоамилазу с определенными промышленно значимыми характеристиками.

Список использованных источников

1. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering / J. Sauer [et al.] // Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Protein Str. Mol. Enzym. – 2000. – Vol. 1543, N 2. – P. 275–293. https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00232-6

2. Marín-Navarro, J. Glucoamylases: structural and biotechnological aspects / J. Marín-Navarro, J. Polaina // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 89, N 5. – P. 1267–1273. https://doi.org/10.1007/s00253-010-3034-0

3. Грачева, И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – М. : Элевар, 2000. – 512 с.

4. Kumar, P. Microbial glucoamylases: characteristics and applications / P. Kumar, T. Satyanarayana // Crit. Rev. Biotechnol. – 2009. – Vol. 29, N 3. – P. 225–255. https://doi.org/10.1080/07388550903136076

5. Coutinho, P. M. Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships / P. M.Coutinho, P. J. Reilly // Proteins: Struct. Funct. Genet. – 1997. – Vol. 29, N 3. – P. 334–347. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(199711)29:3<334::aid-prot7>3.0.co;2-a

6. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases / D. G. Gibson [et al.] // Nat. Meth. – 2009. – Vol. 6, N 5. – P. 343–345. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318

7. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome / D. G. Gibson [et al.] // Science. – 2010. – Vol. 329, N 5987. – P. 52–56. https://doi.org/10.1126/science.1190719

8. Rapid hierarchical assembly of medium-size DNA cassettes / J. L. Schmid-Burgk [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2012. – Vol. 40, N 12. – P. e92. https://doi.org/10.1093/nar/gks236

9. Datsenko, K. A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K. A. Datsenko, B. L. Wanner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, N 12. – P. 6640–6645. https://doi.org/10.1073/pnas.120163297

10. Watson, J. F. *In vivo* DNA assembly using common laboratory bacteria: a re-emerging tool to simplify molecular cloning / J. F. Watson, J. García-Nafría // J. Biol. Chem. – 2019. – Vol. 294, N 42. – P. 15271–15281. https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.009109

11. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes / A. J. M. Walhout [et al.] // Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins – Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics / ed. : J. Thorner, S. D. Emr, J. N. Abelson. – New York ; London, 2000. – P. 575–592. – (Methods in Enzymology ; Vol. 328).

12. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // PloS ONE. – 2009. – Vol. 4, N 7. – P. e6441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441

13. Bryksin, A. V. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids / A. V. Bryksin, I. Matsumura // Biotechniques. – 2010. – Vol. 48, N 6. – P. 463–465. https://doi.org/10.2144/000113418

14. Zuo, P. One-step DNA fragment assembly and circularization for gene cloning / P. Zuo, A. B. M. Rabie // Curr. Iss. Mol. Biol. – 2009. – Vol. 12, N 1. – P. 11–16.

References

1. Sauer J., Sigurskjold B. W., Christensen U., Frandsen T. P., Mirgorodskaya E., Harrison M., Roepstorff P., Svensson B. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, vol. 1543, no. 2, pp. 275–293. https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00232-6

2. Marín-Navarro J., Polaina J. Glucoamylases: structural and biotechnological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 89, no. 5, pp. 1267–1273. https://doi.org/10.1007/s00253-010-3034-0

3. Gratcheva I. M., Krivova A. Yu. *Enzyme technology*. Moscow, Elevar Publ., 2000. 512 p. (in Russian).

4. Kumar P., Satyanarayana T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2009, vol. 29, no. 3, pp. 225–255. https://doi.org/10.1080/07388550903136076

5. Coutinho P. M., Reilly P. J. Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1997, vol. 29, no. 3, pp. 334–347. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(199711)29:3<334::aid-prot7>3.0.co;2-a

6. Gibson D. G., Young L., Chuang R.-Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 2009, vol. 6, no. 5, pp. 343–345. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318

7. Gibson D. G., Glass J. I., Lartigue C., Noskov V. N., Chuang R. Y., Algire M. A. [et al.]. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, vol. 329, no. 5987, pp. 52–56. https://doi.org/10.1126/science.1190719

8. Schmid-Burgk J. L., Xie Z., Frank S., Winter S. V., Mitschka S., Kolanus W., Murray A., Benenson Y. Rapid hierarchical assembly of medium-size DNA cassettes. *Nucleic Acids Research*, 2012, vol. 40, no. 12, p. e92. https://doi.org/10.1093/nar/gks236

9. Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645. https://doi.org/10.1073/pnas.120163297

10. Watson J. F., García-Nafría J. *In vivo* DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, vol. 294, no. 42, pp. 15271–15281. https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.009109

11. Walhout A. J. M., Temple G. F., Brasch M. A., Hartley J. L., Lorson M. A., van den Heuvel S., Vidal M. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology. Vol. 328. Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins – Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics*. New York, London, 2000, pp. 575–592. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)28419-x

12. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PloS ONE*, 2009, vol. 4, no. 7, p. e6441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441

13. Bryksin A. V., Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 2010, vol. 48, no. 6, pp. 463–465. https://doi.org/10.2144/000113418

14. Zuo P., Rabie A. B. M. One-step DNA fragment assembly and circularization for gene cloning. *Current Issues in Molecular Biology*, 2009, vol. 12, no. 1, pp. 11–16.

Информация об авторах

Кулик Елена Вячеславовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alena.kulik31@gmail.com

Селезнева Юлия Валерьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mamalanka@mail.ru

Качан Александр Вячеславович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: av.kachan@mail.ru

Русь Ольга Борисовна – канд. хим. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zrbio@mail.ru

Евтушенков Анатолий Николаевич – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: evtushenkov@bsu.by

Information about the authors

Alena V. Kulik – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alena.kulik31@gmail.com

Yuliya V. Selezneva – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mamalanka@mail.ru

Alexandr V. Kachan – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: av.kachan@mail.ru

Olga B. Rus – Ph. D. (Chem.), Assistant Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zrbio@mail.ru

Anatoliy N. Evtushenkov – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: evtushenkov@bsu.by