

Лекция 6

Метод гибридизации и его использование для создания продуцентов на основе бактерий

Бактериальные плазмиды.

Конъюгация у бактерий. Создание систем конъюгационного переноса плазмид. Трансдукция как метод создания рекомбинантных геномов. Способы сближения att-сайтов: метод делеций, метод переноса генов в различные участки, метод слияния плазмид, метод необычной посадки профага, интеграция профага через области гомологии. Трансформация бактерий фаговыми и плазмидными ДНК. Особенности трансформации у дрожжей.

Протопласты и сферопласты микроорганизмов. Способы получения протопластов и сферопластов у грамположительных, грамотрицательных бактерий, грибов и дрожжей. Метод слияния протопластов и его использование для получения межвидовых и межродовых генетических рекомбинантов.

6.1. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПЛАЗМИДЫ. КОНЪЮГАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

Плазмиды являются стабильно наследуемыми репликонами во вне-хромосомном состоянии и способны передаваться от одной бактериальной клетки к другой в результате конъюгации, обеспечивая генетический обмен между клетками. В настоящее время плазмиды обнаружены и у низших эукариот. Создавая систему обмена, исследователь выбирает соответствующую его целям плазмиду, учитывая ее характеристики: размер, количество копий, организацию, свойства. Поэтому плазмиды являются одним из широко используемых инструментов генной инженерии *in vivo*.

Размер. Молекулярная масса известных плазмид варьирует от 1,5 до 300 МД. Известно, что 1 МД эквивалентен 1500 парам оснований, что достаточно для кодирования 1-2 белков среднего размера.

Количество копий. В клетке может содержаться от 10 до 200 копий мелких плазмид, в то время как число крупных не превышает 1-4.

Организация. Молекулы ДНК плазмид могут существовать в сверх-скрученном виде с ковалентно замкнутыми цепями. Благодаря такой структуре они не подвергаются действию нуклеаз. Существуют также линейные плазмиды, на которые нуклеазы также не действуют, поскольку нити на концах ДНК защищены белками либо соединены ковалентно.

Клетки, в которые включаются плазмиды, приобретают новые признаки. Эти признаки легли в основу названий:

F-плазмиды - придают клеткам донорные свойства (несут фактор фертильности).

Col-плазмиды - обуславливают синтез колицинов.

R-плазмиды - придают клеткам антибиотикорезистентность.

Общие биологические свойства плазмид:

- способность к автономной репликации;
- конъюгативность;
- интегрируемость;
- совместимость;
- поверхностное исключение;
- маркируемость (придание определенных фенотипических признаков и качеств).

Способность к автономной репликации у плазмид обусловлена наличием сайта начала репликации *ori* и набором генов, обслуживающих ее. Все бактериальные плазмиды несут *ori*-сайт, но гены, кодирующие белки репликативного аппарата, представлены не у всех полно. В этом случае в акте репликации принимают участие хромосомные ферменты. Плазмидный репликон представлен:

- *ori V* - участок инициации транскрипции. Имеет специфическую последовательность нуклеотидов. Некоторые плазмиды могут содержать по 2-3 таких участка;
- *rep* - структурный ген, контролирующий репликацию (*incB*, *incC*, *rep*);
- *incB*, *incC* - явление несовместимости;
- *sop* - ген, негативно контролирующий количество плазмидных копий;
- *par* - набор генов (*sopA*, *sopB*, *incD*), обеспечивающий равномерное распределение плазмидных копий между дочерними клетками. Ген *incD* обеспечивает контакт с цитоплазматической мембраной.

По степени контроля за репликацией различают плазмиды со строгим контролем и плазмиды с ослабленным контролем. Строгость контроля репликации плазмид заключается в синхронности их дупликации с бактериальной хромосомой. Плазмиды со строгим контролем репликации заканчивают репликацию вместе с бактериальной хромосомой, а с ослабленным контролем - продолжают реплицироваться.

Плазмид со строгим контролем репликации в клетке не более 3 копий. Их размер составляет от 20 до 200 т. п. н. Плазмиды с ослабленным контролем репликации вместо ДНК-полимеразы III используют ДНК-полимеразу I. Таких плазмид в клетке 40-50 копий. В связи с этим такие плазмиды называют *мультикопийными*. Их размер не превышает 30 т. п. н.

Конъюгативность плазмид - способность переноситься из клетки в клетку при конъюгации. В зависимости от присутствия этой функции различают конъюгативные и неконъюгативные плазмиды. Конъюгативные плазмиды содержат систему переноса - F-фактор. Система переноса контролируется более чем 20 генами и занимает до 1/3 плазмидной ДНК. Функционирование этих генов обеспечивает 2 основных этапа конъюгации:

- образование скрещивающихся пар;
- перенос и репликацию ДНК.

Образование скрещивающихся пар детерминируется образованием половых ворсинок - F-пилей, которые формируются только на донорских клетках. Образование F-пилей контролируется генами от *traA* до *traG* *tra*-оперона. От донора к реципиенту переносится только одна нить плазмидной ДНК. Началом переноса является сайт *oriT*, где с помощью продуктов генов *traY* и *traZ* образуется одностранный разрыв. Затем с участием гена *traD* происходит разделение нитей ДНК и образование кольцевых структур плазмидных ДНК. Экспрессия *tra*-генов регулируется на генетическом уровне. Транскрипция *tra*-оперона инициируется продуктом гена *traJ*. Его экспрессия репрессируется совместным действием продуктов генов *finO* и *finP*. F-плазмиды не синтезируют продукт гена *finO*, поэтому система конъюгационного переноса у них дерепрессируется. Гены *traS* и *traT* отвечают за явление поверхностного исключения.

R-плазмиды и Col-плазмиды не содержат детерминант переноса и не способны самостоятельно передаваться от клеток к клеткам. Однако такие плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью других плазмид. Такой процесс называется *мобилизацией*. При этом неконъюгативная плаزمид является мобилизуемой, а конъюгативная - мобилизующей.

Известны 2 основных механизма мобилизации неконъюгативных плазмид:

- перенос неконъюгативной плазмиды за счет продуктов *tra*-генов конъюгативной. В процессе участвует *oriT*-сайт неконъюгативной плазмиды и ее гены *mob*;
- перенос неконъюгативной плазмиды в составе коинтегратов с конъюгативными плазмидами. Образование коинтегратов происходит при объединении двух и более репликонов за счет реципрокной рекомбинации по участкам гомологии между репликонами. Такие участки могут создаваться IS- и Tn-элементами.

При этом плазмиды со строгим контролем репликации подчиняются репликативному аппарату бактериальной хромосомы и могут существовать в ее составе неопределенно долго. Такие плазмиды с двойным образом жизни получили название эписом.

Интегрируемость в бактериальный геном. Процесс протекает через области гомологии. Конъюгативные плазмиды способны к мобилизации хромосомных генов, что широко используется для получения рекомбинантов у бактерий. Рекомбинантная ДНК образуется в результате спаривания с гомологичными областями хромосомы реципиента (которые создаются Is₂, IS₃ и Tn1000 последовательностями).

Несовместимость. Некоторые плазмиды не способны стабильно существовать в одной и той же клетке. Такие плазмиды названы несовместимыми. Это обусловлено: а) блокированием репликации; б) распределением дочерних молекул ДНК по клеткам. Несовместимость плазмид вызвана блокированием репликации (репрессия *гер*-белка) и блокирование распределения дочерних молекул ДНК (репрессия *Par*-белка). Последняя характерна для низкокопийных плазмид. Тест на совместимость позволяет разделять плазмиды на группы несовместимости - Inc-группы (от *incompatibility* - несовместимость). Плазмиды, входящие в одну группу, исключают друг друга.

Поверхностное исключение. Конъюгативным плазмидам свойственно явление поверхностного исключения. Оно возникает в случае проникновения в клетку, уже содержащую плазмиду, еще одной плазмиды, и связано с трудностями преодоления плазмидной ДНК барьера в виде клеточной стенки. Перенос плазмид в этом случае падает в 10-100 раз.

Маркируемость. Плазмиды могут маркировать клетку, придавая ей различные свойства:

- устойчивость к антибиотикам (всего более 20);
- устойчивость к катионам (висмута, кадмия, кобальта, ртути, свинца, сурьмы);
- анионам (арсениту, арсенату);
- мутагенам (акридиновым красителям, УФ-свету);
- бактериоцинам;
- способность к биодegradации (толуола, ксилола, нафтола);
- синтез антибиотиков, бактериоцинов, пигментов;
- индукция опухолей у растений.

Понимание общих механизмов конъюгации, применение транспозонов, генно-инженерных подходов позволяет создавать на основе плазмид систем конъюгации для промышленно важных видов бактерий. Так, плазмиды *Inc P1*-группы несовместимости (RP4, R68.45) широкого круга хозяев способны передаваться в десятки видов грамотрицательных бактерий. Они используются для мобилизации хромосомных генов у *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Methylobacter*, *Rhizobium* и др. Плазмида pAMp1, выделенная из *Streptococcus faecalis*, переносится в клетки *Lactobacillus casei*, *B. subtilis*, *St. aureus* и др. Конъюгативная плазмида pJP501, обнаруженная у *Streptococcus agalacticae*, способна поддерживаться как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий.

Используя общие свойства плазмид, можно разработать системы конъюгационного переноса на основе плазмид с широким кругом хозяев. При этом нужно учитывать сложности, которые могут возникнуть при конъюгации:

- клетки некоторых штаммов, особенно неродственных, могут не вступать в контакт;
- донорная ДНК, попав в клетку-реципиент, может подвергнуться действию ферментов рестрикции;
- чужеродная плазмида должна быть совместима с плазмидой клетки-хозяина.

Плазмиды, интегрированные в хромосому, могут исключаться из нее и снова переходить в интегрированное состояние. Иногда этот процесс сопровождается захватом соседних хромосомных генов, которые становятся частью плазмидного репликона. При этом образуются F- или R-факторы.

Наглядным примером конструирования штамма с помощью переноса конъюгативных плазмид служит штамм *Pseudomonas putida*, утилизирующий нефть. В результате серии скрещиваний был получен штамм, несущий плазмиды ХУL и NАН и гибридную плазмиду, содержащую коинтеграцию плазмид ОСТ и САМ. Такой мультиплазмидный штамм усваивает неочищенную нефть в сотни раз эффективнее, чем несущие единичные плазмиды.

Еще одним примером использования конъюгативных плазмид в конструировании штаммов-продуцентов является создание гибридной плазмиды рУп7, которая на фрагменте хромосомы из штамма *E. coli* MG442, несла все фрагменты треонинового оперона.

6.2 ТРАНСДУКЦИРУЮЩИЕ ФАГИ

Трансдукция - это перенос бактериальных генов от клетки-донора к клетке-реципиенту с помощью фагов. Явление было открыто на умеренном бактериофаге Х и в настоящее время ДНК фага Х является наиболее широко используемым в генетике вектором.

Умеренные фаги могут развиваться в клетке по двум путям: литическому и лизогенному. Выбор пути развития фага решается к концу раннего периода. Лизогенное состояние в клетке обусловлено транскрипцией с промоторов рZ, рI и рЕ, а литическое - транскрипцией с промоторов рR и рR. Лизогенное состояние фага Х обуславливается подавлением транскрипции ранних оперонов продуктом гена *cI* и интеграцией фаговой ДНК в бактериальную хромосому (процесс регулируется продуктами генов *cII* и *cIII*). Литический путь развития фага Х определяется транскрипцией гена *cro*, который выключает транскрипцию гена *cI*. В итоге судьба фага определяется соотношением концентраций продуктов *cII/cIII* и *cro*. Это соотношение зависит от физиологического состояния клетки в момент инфекции.

Умеренные фаги вообще и фаг Х в частности интересны с точки зрения конструирования штаммов-продуцентов по двум причинам:

- 1) способностью к интеграции в бактериальную хромосому;
- 2) способностью к трансдукции.

При выпадении больших участков ДНК фаговый геном может превращаться в автономную плазмиду (например, Хdv).

Интеграция фага X в бактериальную хромосому и образование трансдуцирующего фага. Образование трансдуцирующего фага происходит по механизму сайт-специфической рекомбинации. Интеграция фага X в бактериальную ДНК происходит через специфические att-сайты с помощью фагового белка *Int* (который, будучи топоизомеразой, разрезает нити ДНК) и бактериального белка *HimA*. Сайты устроены сходным образом, их основу составляют одинаковые последовательности - O, фланкированные участками определенного строения (у бактерий ВВ, а у фагов - РР, поэтому att-сайты имеют строение ВОВ и РОР соответственно). Специфический сайт на ХДНК attРОР расположен между генами *int* и *xis*. Его сайт прикрепления на хромосоме attВОВ расположен между генами двух оперонов *gal* и *bio*. В результате работы фагового белка *Int* образуются ступенчатые разрывы, имеющие комплементарные участки из 7 нуклеотидов. Происходит рекомбинация на этих участках и в результате встраивания фага образуются рекомбинантные сайты РОВ и ВОР.

Интеграция фага в бактериальную хромосому осуществляется за счет фагового белка *Int* и бактериального *HimA* в O-участках att-сайтов фага и бактерии. Белок *Int* (топоизомераза) делает разрезание в O-участках att-сайтов, что приводит к ступенчатым двухнитевым разрезам. При этом фаговая ДНК встраивается в хромосому, а на концах профага остаются рекомбинантные att-сайты РОВ(справа) и ВОР' (слева).

В случае индукции снимается репрессия с гена *xis*, и профаг с помощью белков *Int* и *Xis* вырезается из хромосомы. Профаг стабилен в отсутствие белка *Xis*; транскрипция *xis* блокируется репрессором фага X. Зачастую вырезание профага происходит неточно (с частотой 10^{-6}) с захватом генов, расположенных слева и справа от него. В результате образуется трансдуцирующий фаг.

Для образования трансдуцирующих фагов, несущих определенные бактериальные гены, необходимо, чтобы:

- интересующие гены были расположены близко к месту посадки профага (att-сайт может быть удален не более чем на 10-20 т. п. н.; чем ближе расположен ген, тем вероятнее его перенос трансдуцирующим фагом). Разработаны специальные методы сближения att-сайтов с выделяемыми генами;
- в геноме фага был сохраненен *cos*-сайт (который необходим для упаковки ХДНК в головку фага).

Молекулы ДНК, длина которых превышает длину ХДНК более чем на 5-6 %, не упаковываются, поэтому при включении части бактериальных генов в фаговый геном, часть фаговой ДНК теряется и образующиеся трансдуцирующие фаги дефектны. Интересно, что почти все несущественные для фага гены сгруппированы вместе и расположены на концах профагов. Замена этих генов на бактериальные не вызывает изменений жизнеспособности.

Учитывая это, разработаны методы сближения att-сайтов выделяемыми генами.

Метод делеций основан на удалении части ДНК между att-сайта и искомым геном. Например, оперон *tolAB* находится на расстоянии 25 т. п. н. от сайта *attB*, поэтому не может включиться в трансдуцирующий фаг. После удаления генов *nodA-aroG-gal-chlD* (около 150 т. п. н.) образуется фаг *XtolAB*.

Метод переноса генов в разные участки бактериальной хромосомы с помощью плазмид был разработан Кузеном и Жакобом на основе термочувствительной плазмиды *F^{ts} lac*. Плаزمида интегрируется по обе стороны от фага, а термочувствительность ее репликации является селективным маркером для отбора клеток с интегрированными плазмидами.

Метод слияния плазмид основан на сближении бактериального *att*-сайта с выделяемым геном путем рекомбинации плазмид. Отбор рекомбинантных молекул базируется на свойстве несовместимости родственных плазмид. Например, осуществляется конъюгация клеток *E. coli* K-12 *recA⁻ metB⁻ argG⁻ / F⁺ metB⁺ argE⁺ recA⁻ trp⁻ / F⁻ trp⁺ att δ 80* на селективной среде без *met*, *arg*, *trp* развиваются только клетки с рекомбинантной плазмидой *F⁺ metB⁺ argE⁺ trp⁺ att080*.

Метод необычных посадок профага. Фаг может быть интегрирован в другие участки - вторичные *att*-сайты. Это особенно эффективно достигается при делетировании основного *attB*-сайта. Вторичные *att*-сайты также представлены строго определенными нуклеотидными последовательностями, насыщенными Т. Для эффективной интеграции профага X нужна полная гомология участков O фагового и бактериального *att*-сайтов. Необычная интеграция профага внутри гена приводит к инактивации последнего. Но в этом случае можно выделить фаг, несущий неповрежденный ген. Например, из штамма, в котором профаг X интегрирован в ген *trpC*, выделены фаги *XtrpABC* и *XtrpCDE*. Их рекомбинация между собой по *att*-сайтам дала возможность восстановить *trp*-оперон и получить фаг *XptrpABCDE*.

Интеграция профага через области гомологии с помощью *recA*-зависимой рекомбинации. Для создания областей гомологии используют плазмиды, фагМ и транспозоны. Например, если необходимо провести направленную интеграцию профага, то рядом с интересующим бактериальным геном внедряют гомологичный элемент. Так, например, была осуществлена посадка профага X: :IS2 рядом с опероном *gal*.

При внедрении в трансдуцирующие фаги транспозонов первые приобретают способность переносить бактериальные гены с помощью механизма транспозиции.

С помощью трансдукции создаются промышленные продуценты. Так, с помощью трансдукций был сконструирован штамм *E. coli* VL334, имеющий генотип *thrC1010ilvA442 relA+*, и несущий гибридную плазмиду. Штамм продуцирует до 20 г/л треонина. Путем трансдукции фагом PS20 был получен штамм *Serratia marcescens* - эффективный продуцент изолейцина, накапливающий до 25 г/л этой аминокислоты.

6.3 ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформацией называют перенос экзогенной ДНК в клетку реципиента, в результате которого происходят наследственные изменения этой клетки. Этот перенос касается как целых молекул ДНК, так и их фрагментов. Способностью к переносу обладает ДНК различной природы: хромосомальная, плазмидная, фаговая. При трансфекции наблюдается перенос всего генома вируса или фага, в результате чего в клетке-реципиенте развивается жизнеспособный вирус. При передаче плазмид также происходит перенесение целого репликона.

Частоту трансформации определяют как отношение количества трансформированных клеток к общему количеству жизнеспособных клеток реципиента. Обычно эта величина составляет 10^{-4} - 10^{-6} . В случае трансформации плазмидными ДНК эффективность трансформации выражают количеством трансформантов на 1 мкг трансформирующей ДНК (среднее значение - 10^{-5} трансформантов на 1 мкг ДНК). В случае трансфекции фаговыми ДНК эффективность трансформации определяют как количество инфекционных центров фага, возникших в расчете на один фаговый эквивалент ДНК.

6.3.1. Трансформация бактерий

Условия трансформации. В первых же опытах по трансформации было отмечено, что процесс трансформации происходит тогда, когда бактерии находятся в определенном физиологическом состоянии. Компетентность - это физиологическое состояние клетки, в котором они способны эффективно связывать экзогенную ДНК. Эта величина не является постоянной характеристикой культуры. Время наступления компетентного состояния клетки и продолжительность этого состояния различаются для разных видов бактерий и зависят от условий выращивания. Многие виды бактерий вообще не имеют естественной компетентности и осуществить у них трансформацию можно только после соответствующей обработки.

Эффективность трансформации повышается:

- 1) при низких температурах;
- 2) наличии ионов двухвалентных металлов;
 - 1) если подвергать смесь клеток и ДНК тепловому шоку;
 - 2) вводить в эту смесь моновалентные ионы;
 - 3) при добавлении хлорида кобальта (III);
 - 4) обработке клеток растворителями и сульфгидрильными реагентами;
 - 5) при выращивании клеток в среде с повышенным содержанием Mg (10-20 mM).

Факторы компетентности выделены и очищены у *Pneumococcus* и *Haemophilus influenzae*. Это белки с молекулярной массой 5-10 МД, которые не взаимодействуют с ДНК *in vitro*, а связываются с цитоплазматической мембраной, изменяя ее проницаемость для экзогенной ДНК.

Развитие компетентного состояния регулируется рядом белков, которые участвуют в адсорбции и поглощении ДНК.

Таким образом, естественная компетентность бактерий обусловлена существованием механизмов, которые обеспечивают связывание, сохранение и транспорт трансформирующей ДНК через мембраны.

Молекулярные механизмы трансформации описаны довольно детально и наиболее хорошо изучены у *B. subtilis*. При добавлении трансформирующей ДНК к реципиентной культуре она быстро связывается с поверхностью клетки, прикрепляясь к определенным рецепторам одним концом. Процесс вхождения в клетку также осуществляется с одного конца, т. е. он является полярным.

После связывания с клеточной поверхностью происходит фрагментирование двухнитевых молекул до фрагментов с молекулярной массой около 20 МД. Однако эти фрагменты чувствительны к внеклеточной ДНКазе и могут быть удалены с поверхности компетентных клеток мягкой обработкой. В процессе проникновения донорной ДНК в клетку реципиента одна из ее нитей разрушается, а в клетку поступает лишь одонитевая ДНК весом 3-6 МД. В среде остается кислоторастворимый материал в виде мононуклеотидов, причем количество одонитевой ДНК соответствует количеству образовавшихся мононуклеотидов. На этой стадии одонитевые фрагменты уже устойчивы к действию ДНКазы. Далее донорные фрагменты вступают в комплекс с ДНК реципиента по области гомологии, включаясь в нее. При этом соответствующий участок нити ДНК реципиента выбрасывается из хромосомы. Происходит формирование гетеродуплекса, в котором одна нить принадлежит реципиенту, а другая - донору. Таким образом, трансформация хромосомальной ДНК осуществляется с протеканием рекомбинации.

Долгое время не удавалось осуществить трансформацию *E. coli*. Индуцировать компетентное состояние клетки можно разными способами. Наиболее распространена обработка раствором CaCl_2 и другими щелочно-земельными металлами на холоду. В присутствии ионов Ca^{2+} двухнитевая РНК стимулирует трансформацию и трансфекцию. Повысить эффективность трансформации можно инкубированием клеток в трис-НС1 буфере (рН 8,3-8,9) с добавлением 20 % сахарозы либо при внесении ПЭГ. Глубокое замораживание клеток с последующим их оттаиванием также обеспечивает повышение эффективности (метод криотрансформации или криотрансфекции).

6.3.2. Трансформация фаговыми ДНК

При трансфекции задействованы те же механизмы, что и при трансформации. Различие состоит в том, что не происходит акта рекомбинации с хромосомой реципиентной клетки. В определенной степени трансфекция сходна с инфекцией фаговой ДНК. Однако при инфекции вирус адсорбируется в определенном месте клеточной поверхности и вводит свою ДНК совершенно иным способом. Эффективность трансфекции зависит:

- от генотипа бактерий (отмечено снижение инфекционности линейной Х ДНК под действием нуклеазы *hcsBC*);

- структуры трансфицирующей ДНК (показано, что такой активностью обладают как кольцевые, так и линейные молекулы. Однако кольцевая структура трансфицирующей ДНК или способность ДНК замыкаться в кольцо быстро после проникновения в клетку являются условием высокой инфицирующей способности ДНК, так как такие ДНК меньше других подвержены действию нуклеаз).

6.3.3 Трансформация бактерий плазмидными ДНК

Трансформация бактерий плазмидными ДНК была впервые продемонстрирована Коэном после того, как было показано, что совместная инкубация *E. coli* и бактериофага X при 0 °С в присутствии хлорида кальция приводит к инфекции. Трансформация плазмидными и фаговыми ДНК не сопровождается образованием рекомбинантов с хромосомой и завершается слиянием репликонов. Перенос разных плазмид среди штаммов *Enterobacteriaceae* при конъюгации и трансдукции известен давно. А вот трансформация в другие клетки при помощи плазмидной ДНК показана сравнительно недавно и стала широко использоваться в генной инженерии.

Существенное значение для эффективной трансформации имеет структура плазмидной ДНК. Наиболее эффективно протекает она у ковалентнозамкнутых суперскрученных плазмид. Открытые кольца плазмидных ДНК обладают в 2 раза меньшей трансформирующей активностью. Линейные молекулы плазмид, полученные путем обработки рестриктазами, сохраняют от 0,1 до 10 % активности.

6.3.4. Трансформация дрожжей

Первые работы по трансформации дрожжей были проведены в 1978 г. и ознаменовали эру генной инженерии дрожжей. Работа проводилась с использованием в качестве реципиентов протопластов дрожжей (leu-), а в качестве донорной ДНК не суммарной ДНК дрожжей, а рекомбинантной ДНК плазмиды ColE1. Было показано, что при трансформации происходит с частотой 10^{-7} . В настоящее время используется серия векторов YIp, несущих гены дрожжей и содержащих репликон бактериальной плазмиды.

6.4 СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ И СФЕРОПЛАСТОВ У МИКРООРГАНИЗМОВ. СЛИЯНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ КАК МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖВИДОВЫХ И МЕЖРОДОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАНТОВ

Протопласты - это клетки с полностью удаленными клеточными стенками. Когда структура несет определенные остатки клеточной стенки, ее называют сферопластом.

В последнее время метод слияния протопластов стал одним из распространенных способов получения сверхпродуцентов среди бактерий, актиномицетов, дрожжей и грибов. Этот метод позволяет получить генетические рекомбинанты у тех видов и штаммов, у которых не обнаружены собственные системы обмена генетической информацией и которые не способны скрещиваться между собой.

Сферопласты и протопласты получают несколькими способами:

- а) подавлением синтеза клеточной стенки;
- б) путем лизиса уже синтезированной клеточной стенки.

Следует отметить, что необходимым условием обоих способов получения протопластов является постановка эксперимента в условиях жидкой среды и осмотической защиты. При устранении этих условий полученные протопласты либо ревертируют к исходному типу и восстанавливают функции, присущие бактериальной клетке, либо лизируют. Поэтому все манипуляции по получению протопластов проводят в присутствии осмотических стабилизаторов (KCl, NaCl, NH₄Cl, NaNO₃, сукцинат, сорбитол, сахароза и др.) в концентрациях, имитирующих внутриклеточное давление (0,2-0,5 М). Кроме того, образование и сохранение протопластов зависит от температуры и рН среды, концентрации нарушающего агента, времени обработки и возраста обрабатываемой культуры.

6.4.1 Подавление синтеза

Подавление синтеза клеточной стенки осуществляют с применением структурных аналогов клеточной стенки и веществ, нарушающих нормальный синтез ее компонентов - антибиотиков (пенициллин, циклосерин или фосфомицин) и некоторых аминокислот (глицин, D-треонин, метионин).

Этот метод основан на способности данных соединений нарушать синтез пептидогликана. Однако применение этого метода целесообразно лишь для активно растущих клеток с активным синтезом цитоплазматических компонентов. Показано также, что для грамположительных бактерий этот метод не пригоден, так как мукополимерный слой в их клеточной стенке не защищен дополнительными слоями, как у грамотрицательных бактерий. При культивировании с антибиотиками такие клетки претерпевают лизис. Вместе с тем имеются данные о получении протопластов глутаматпродуцирующих бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Br. flavum* путем совмещения обработки малыми концентрациями пенициллина (0,1-0,5 ед/мл) с длительной обработкой лизоцимом (в течение 20 ч). В этом случае протопласты были получены у 99 % популяции.

Получению протопластов с помощью аминокислот всегда предшествует длительное инкубирование бактериальных клеток в среде с высоким содержанием соответствующей аминокислоты (до 5 % и выше). Как правило, после этого суспензию обрабатывают агентами, лизирующими клеточную стенку. Предполагается, что аминокислота лишь частично нарушает структуру клеточной стенки и тем самым делает ее более чувствительной для литических агентов. Иногда для более успешного образования протопластов инкубации с аминокислотой предшествует обработка твином-80, после чего в среду вносят аминокислоту и продолжают инкубацию.

6.4.2 Метод ферментативного лизиса клеточной стенки

С этой целью у бактерий используют преимущественно ферменты животного происхождения (лизоцим, пищеварительный сок виноградной улитки и др.), а также фаговый лизин, лизостафин (для стафилококков), мутанолизин (для молочнокислых бактерий). Трудности получения литических ферментов животного происхождения и невысокая эффективность других литических агентов обусловили поиск энзимов микробного происхождения. В настоящее время широко используются ферменты актиномицетов (*Actinomyces* и *Micromonospora*). Это сложный комплекс ферментов, представленный глюканазами, протеазами, липазами, хитиназами и др. Особенно ценны эти ферменты тем, что обладают высокой глюказной активностью, особенно в отношении клеточных стенок дрожжей и мицелиальных грибов.

Многокомпонентность таких ферментных систем обеспечивает быстрый и практически полный лизис сложных по строению клеточных стенок. Для получения протопластов среди дрожжей родов *Candida* и *Saccharomyces* успешно применяются литические комплексы *Streptomyces spp.* и *Bacillus circulans*. Для получения грибных протопластов у *Fusarium culmorum*, *Aspergillus nidulans*, *Trichothecium roseum* используют литический комплекс *Micromonospora*.

Процесс образования протопластов у дрожжей и мицелиальных грибов отличается от аналогичного у бактерий, хотя методы, используемые для их получения, применяются те же. При воздействии на грибную клеточную стенку литических энзимов образуется пора, через которую затем протоплазма выходит в окружающую среду. В присутствии стабилизатора осмотического давления благодаря поверхностному натяжению мембраны клетка приобретает сферическую форму - образуется протопласт. У дрожжевых клеток пора обычно появляется на одном из полюсов клетки или в экваториальной зоне.

6.4.3 Слияние протопластов

Получив протопласты, можно приступить к их слиянию или трансформировать их чужеродной ДНК. Метод слияния протопластов стал одним из важных методов получения генетических рекомбинантов. Преимущества этого метода по сравнению с другими способами обмена генетической информацией очевидны:

- преодоление барьера нескрещиваемости при переводе клеток в протопласты;
- слияние не только геномов, но и родительских цитоплазм;
- отсутствие направленности генетического переноса - оба родителя являются донорами;
- в одной клетке можно объединить не только два генома, но три и более;
- слияние протопластов осуществляют не только для представителей разных видов, но и родов. Есть данные о слиянии протопластов разных царств (эритроцитов млекопитающих и дрожжевых протопластов).

Слияние цитоплазм обоих родителей является очень существенным фактом при селекции продуцентов вторичных метаболитов, синтез которых регулируется внехромосомными детерминантами.

Например, высокая частота наследования фузантами способности к сверхпродукции актиномина D при слиянии протопластов продуцирующих и непродуцирующих штаммов *Streptomyces parvulus* указывает на передачу этого признака через плазмидные гены.

Приемы, используемые при слиянии протопластов одинаковы для всех микроорганизмов. Прежде всего у отобранных штаммов получают протопласты. Их смешивают в соотношении 1:1 и центрифугируют, ресуспендируют и добавляют ПЭГ (полиэтиленгликоль). Он является эффективным индуктором слияния протопластов, действие которого сводится к тому, что он снижает поверхностный заряд протопластов и связывает окружающую их поверхность воду. Это создает условия для тесного контакта и слипания мембран протопластов. В местах слипания происходит разрыв мембран и содержимое объединяется под одной мембраной. Следует отметить, что появившиеся гибриды сохраняют способность к восстановлению клеточной стенки. ПЭГ является универсальным индуктором слияния протопластов и используется у всех видов микроорганизмов. Он также обеспечивает эффективную трансформацию и трансфекцию. Слияние протопластов регулируется некоторыми ионами. Так, ионы Ca^{2+} повышают частоту слияния, ионы Mn^{2+} - ингибируют. Повышение температуры также стимулирует слияние. Однако этот процесс может идти и при 4 °С.

Для выявления рекомбинантного потомства необходимо обеспечить селективные условия, которые не будут предотвращать реверсии рекомбинантов к клеточным формам. Так как в слиянии протопластов отбирают генетически маркированные штаммы (по питательным потребностям, антибиотикоустойчивости, температурочувствительности и т. д.), то признаком успешного слияния является фенотипическая комплементация. Подсчет частоты слияния основан на учете частоты комплементации, хотя эти два события не всегда коррелируют. Ведь образующиеся полиплоиды у бактерий и гетерокарионы у эукариот в неселективных условиях всегда выплывают гаплоидные рекомбинанты и исходные родительские формы. Учет потомства клонов, образовавшихся после слияния протопластов *V. megaterium*, выявил следующие подклассы клонов:

- клоны, дающие однородное стабильное потомство;
- смешанную популяцию стабильных форм;
- смешанную популяцию нестабильных форм.

Очевидно, что первый класс представлен гаплоидными рекомбинантами, второй и третий - диплоидами.

У мицелиальных грибов продукты слияния протопластов представляют собой комплементирующие гетерокарионы, которые легко распадаются на родительские формы. У дрожжей стадия гетерокариона очень непродолжительна и продукты слияния протопластов представляют собой диплоиды.

6.4.4 Трансформация протопластов

В современной селекции продуцентов метод слияния протопластов сам по себе утратил свое значение. Гораздо шире используются его модификации. Например, конструирование штаммов методом плазмидной трансформации протопластов. Метод был первоначально разработан для *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Bacillus* и теперь используется как способ введения чужеродной ДНК. Протопласты смешивают с плазмидной ДНК и обрабатывают ПЭГ, что увеличивает эффективность трансформации до 80 %. Протопласты трансформируют кольцевой плазмидной ДНК. Она проникает в протопласты в двухнитевой форме, тогда как линейные плазмиды и фрагменты хромосомальной ДНК слабо трансформируют протопласты, видимо вследствие воздействия нуклеаз. После этого трансформированные протопласты высевают на гипертоническую среду для регенерации клеточной стенки.