

## РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИФЕНИЛА/ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ (ПХБ) НА ОСНОВЕ *bph*-ГЕНОВ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕХНОГЕННЫХ ПОЧВ ЗАПАДНОГО УРАЛА\*

Е.С. Шумкова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН*

М.С. Шумков, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН*

Е.С. Корсакова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Д.О. Егорова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Е.А. Шестакова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Е.Г. Плотникова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Создана генетическая конструкция, представляющая собой модифицированную плазмиду рЕТ19b, в которую под контролем *T7-lac*-промотора введены гены *bph*-оперона (*bphA4*, *bphA123B*) штамма *Rhodococcus ruber* P25. Произвольно индуцированный синтез белковых молекул приводит к появлению в цитоплазме *E. coli* функциональных ферментов «верхнего» пути деградации бифенила/ПХБ, что обеспечивает трансформацию этих поллютантов до химических соединений, являющихся индукторами *clc*-оперона (генов деструкции хлоркатехолов). Гены *clc*-оперона штамма *R. opacus* 1CP помещены в хромосому *E. coli*. Создано генетическое слияние *clcRA::rfp* (основа биосенсора) для детекции продуктов деградации ПХБ и сходных органических соединений.

В процессе работы по конструированию биосенсора проведено полногеномное секвенирование активного деструктора бифенила/ПХБ *R. ruber* P25. Всего было аннотировано 3 677 генов (69,6%). Проект генома депонирован в GenBank под номером NZ\_LDUF00000000.1. Выявлен кластер генов деструкции бифенила/хлорбифенилов. Организация *bph*-оперона у штамма P25 отличается от таковой у известных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ: *bphRorf2orf1A4DCA1A2A3B*. Транскрипция *orf1* и *orf2* идет в направлении, противоположном *bphR* и *bphA4DCA1A2A3B*.

**Ключевые слова:** цельноклеточный биосенсор, полихлорированные бифенилы, гены деструкции бифенила, генетическая конструкция.

Антропогенное загрязнение окружающей среды является одной из наиболее актуальных проблем, стоящих перед современным обществом. К числу поллютан-

тов, входящих в группу «стойких органических загрязнителей» (СОЗ), относятся полихлорированные бифенилы (ПХБ) характеризующиеся чрезвычайно высокой

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-Урал № 13-04-96049.

токсичностью, способностью накапливаться в тканях живых организмов, крайне медленно разлагаться (<http://chm.pops.int>). В настоящее время ПХБ обнаружены практически везде, даже в Арктических регионах, где их никогда не производили и не применяли [1]. В России ПХБ производились в промышленных масштабах (1939–1993 гг.), а предприятия-потребители данных соединений размещались по всей территории РФ, в том числе в Уральском и Поволжском регионах.

Новейшим инструментом, позволяющим проводить мониторинг содержания (биодоступной фракции) бифенила/ПХБ в объектах окружающей среды, является цельноклеточный биосенсор, который представляет собой недорогое и чувствительное средство экспрессного анализа содержания поллютантов в объектах окружающей среды. Такие биосенсоры основаны на анализе экспрессии генов, по принципу транскрипционного слияния интересующего промотора и репортерного гена [2].

Биосенсоры для детекции ПХБ разработаны на основе *bph*-оперонов грамотрицательных бактерий *Burkholderia xenovorans* LB400 или сходных оперонов [3–6]. Проводимые участниками проекта исследования генетических и ферментных систем штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ, выделенных из техногенных почв Западного Урала и других регионов России, свидетельствуют о перспективности использования потенциала бактерий из лабораторной коллекции для данной цели [7–9]. Является актуальным создание биосенсора для детекции бифенила/ПХБ в почвах и водоемах Западного Урала на основе кластеров *bph*-генов родококков, выделенных из техногенных почв.

Цель работы – разработка фундаментальных основ микробных технологий (биосенсора), направленных на мониторинг устойчивых высокотоксичных поллютантов, полихлорбифенилов, в природных и техногенных экосистемах.

### Исследование полиморфизма генов деструкции бифенила/ПХБ (*bph*-генов)

С целью поиска *bph*-генов у бактериальных деструкторов ароматических соединений были подобраны вырожденные праймеры (3 пары) на основе анализа известных нуклеотидных последовательностей генов  $\alpha$ -субъединиц бифенил 2,3-диоксигеназ (БДО) бактерий рода *Rhodococcus*. Праймеры подобраны к консервативным участкам гена *bphA1* и позволяют амплифицировать фрагмент гена, соответствующий кластеру Риска  $\alpha$ -субъединицы БДО.

Проведена экспериментальная проверка праймеров с использованием ДНК бактериальных деструкторов бифенила/ПХБ (24 штамма-деструктора бифенила родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*). С использованием подобранных праймеров у ряда бактериальных деструкторов бифенила/ПХБ (в том числе и у *R. ruber* P25) выявлены *bphA1* гены, отличающиеся от известных генов, кодирующих  $\alpha$ -субъединицы подсемейства БДО.

### Исследование регуляторной области *clc*-оперона бактерий-деструкторов ПХБ

С целью выявления *clc*-оперона (кодирует ферменты деструкции хлоркатехолов) был проведен ПЦР-скрининг штаммов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* из лабораторной коллекции на наличие генов *clcA* (кодирующих хлоркатехол 1,2-диоксигеназу). Гены *clcA* у исследуемых бактерий не были выявлены с использованием предложенных ранее праймеров [10]. Поэтому нами были разработаны вырожденные праймеры на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *clcR* (консервативных участков) бактериальных деструкторов ароматических соединений (включая штамм *R. opacus* 1CP) для амплификации центральной части гена (575 п.н.). С ДНК-матрицы 13 штаммов *R. wratislaviensis* получен ПЦР-продукт размера  $\approx 600$  п.н. Однако при секвенировании выявлена гетерогенность ПЦР-продуктов, что может свидетельствовать о полиморфизме исследуемых генов.

### Секвенирование генома *R. ruber* P25

В качестве источника генов деструкции бифенила для конструирования биосенсора был выбран штамм *R. ruber* P25 – активный деструктор ПХБ [9]. Полногеномное секвенирование штамма было проведено на платформе Roche. В результате секвенирования было получено 194 173 последовательности со средней длиной 450 нуклеотидов, которые затем были собраны в 73 контига. Значение N50 составило 329 488 п.н. Наибольшая длина контига 483 300 п.н. Суммарная длина контигов составила 5 728 255 п.н., что сопоставимо с размером генома *R. pyridinivorans* SB3094 (NC\_023150.1), наиболее близкого по гену 16S рНК к *R. ruber* штамма, для которого известен полный геном.

С целью выявить гены деструкции бифенила в полученных контигах проведен анализ генома, по результатам которого на 7-м контиге (размером 293 873 п.н.) выявлен кластер генов «верхнего пути» деструкции бифенила/ПХБ. Организация *bph*-оперона штамма P25 отличается от таковой у известных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ: *bphRorf2orf1A4DCA1A2A3*. Транскрипция *orf1* и *orf2* идет в направлении, противоположном *bphRu bphA4DCA1A2A3B*. Таким образом, анализ генома штамма *R. ruber* P25 позволил выявить структуру *bph*-оперона и заложил основу проведения генно-инженерных работ по созданию плазмиды для экспрессии генов *bph*-оперона в клетках *E. coli*.

### Создание генетической конструкции для детекции продуктов деградации ПХБ

Для дальнейшей работы по конструированию репортерного слияния *clc::rfp* в качестве источника *clc*-генов выбран штамм *R. opacus* 1CP [11]. На основе известной последовательности *clc*-оперона,

кодирующего ферменты деструкции хлоркатехолов, были подобраны праймеры в двух альтернативных вариантах: для амплификации промотора *clc*-оперона и части гена *clcR*, а также для амплификации промотора, гена *clcR* и части гена *clcA* [11].

Создана генетическая конструкция для детекции продуктов деградации ПХБ и сходных органических соединений, представляющая собой слияние промоторной области *clc*-оперона, амплифицированной на матрице штамма *R. opacus* 1CP, с геном красного флуоресцентного белка *rfp*. Слияние введено в состав хромосомы штамма *E. coli* BL21 DE3 (*E. coli* В F<sup>-</sup> *dcmompThsdS(rB-mB-)* *galλ*(DE3)) в области между генами *yjjV* и *yjjW*. Эти гены транскрибируются навстречу друг другу, что обеспечивает наличие stop-кодонов в активных рамках считывания по обе стороны *clc::rfp* слияния и тем самым предотвращает его экспрессию, не связанную с активацией *clc*-промотора.

Поскольку особенности регуляции экспрессии *clc*-промотора исследованы недостаточно, генное слияние было создано в двух альтернативных вариантах: *clcR::rfp* и *clcRA::rfp*. Помещенное в бактериальную хромосому репортерное слияние представлено на рис. 1.

Способность к индукции двух созданных генно-инженерных конструкций pGEM-T*clcR::rfp*, pGEM-T*clcRA::rfp* в клетках *E. coli* BL21 DE3 была проверена с потенциальными индукторами *clcR*-гена: *цис,цис*-муконат, пирокатехин, 3-метилпирокатехин, 4-метилпирокатехин, 3,5-дихлорпирокатехин, 4-хлорпирокатехин, 4-нитропирокатехин, 2,3-дигидроксибифенил, а также моногидрокси ПХБ.

В результате эксперимента с клетками *E. coli* BL21 DE3, содержащими генное слияние *clcRA::rfp*, было обнаружено три индуктора, оказывающие больше чем

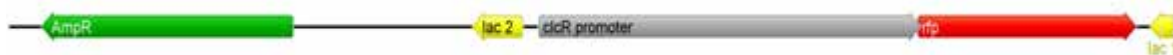


Рис. 1. Схема генного слияния *clcR::rfp*

двукратное увеличение интенсивности уровня флуоресценции относительно контрольных клеток (без добавления индукторов): 3,5-дихлорпирокатехин, 2,3-дигидроксибифенил и моногидрокси-ПХБ (рис. 2).

В опытах с другим рекомбинантным штаммом *E. coli* BL21 DE3, содержащим генное слияние *clcR::rfp*, увеличения уровня флуоресценции с указанными индукторами не было выявлено.

Следующим этапом работы являлось определение уровня флуоресценции при действии индукторов в опытах с «отмытыми» клетками. Установлено, что, как и в ростовом эксперименте, в опытах с «отмытыми» клетками наибольшее увеличение интенсивности уровня флуоресценции выявлено с тремя индукторами: 3,5-ДХПК, 2,3-ДГБ, ПХБ-ОН. При их внесении у клеток с генным слиянием *clcRA::rfp* интенсивность флуоресценции возрастала практически вдвое, в то время как в клетках *E. coli* BL21 DE3 без генных слияний и с генным слиянием *clcR::rfp* уровень флуоресценции оставался на прежнем уровне. Таким образом, для дальнейшей работы выбрано слияние *clcRA::rfp*.

### Генетическая конструкция для экспрессии в клетках *E. coli* генов *bph*-оперона

Создана генетическая конструкция, представляющая собой модифицированную плазмиду pET19b, в которую под контролем T7-*lac*-промотора введены гены *bph*-оперона *R. ruber* P25 (рис. 3).

Ген *bphA4* клонирован по сайтам XhoI/NcoI, а локусы *bphCA123B* или *bphA123B* – по сайтам NcoI/NdeI. Это обеспечивает беспрепятственное регулируемое ИПТГ считывание *bph*-оперона РНК-полимеразой в виде единой полицистронной мРНК. Последующий синтез белковых молекул должен приводить к появлению в цитоплазме *E. coli* функциональных ферментов «верхнего» пути деградации бифенилов/ПХБ, что обеспечивает трансформацию этих поллютантов до химических соединений, являющихся индукторами *clc*-оперона. Сконструированное ранее на основе *clc*-оперона *R. opacus* 1CP*clc::rfp*-слияние в присутствии ПХБ и созданной на этом этапе плазмиды приводит к наработке красного флуоресцентного белка, свечение которого может быть количественно измерено с использованием флуориметра.

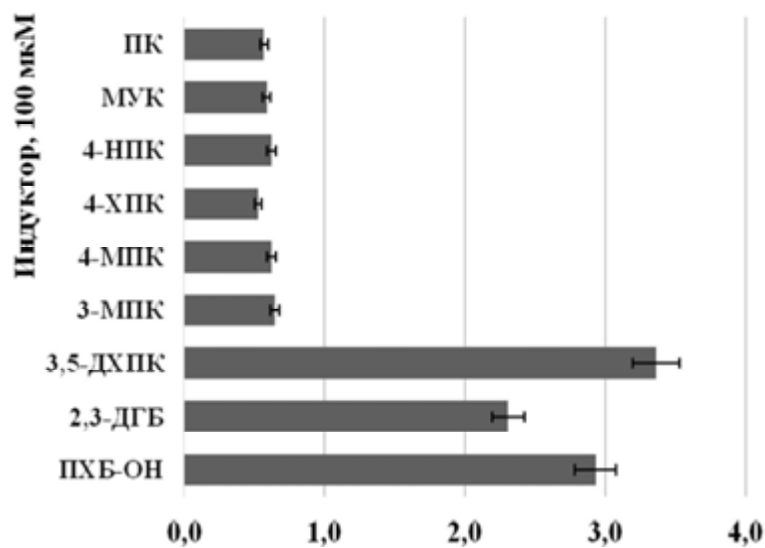


Рис. 2. Изменения интенсивности уровня флуоресценции (6-часовая экспозиция) в клетках *E. coli* BL21 DE3 pGEM-T*clcRA::rfp* при росте на среде LB под действием индукторов относительно контрольных клеток

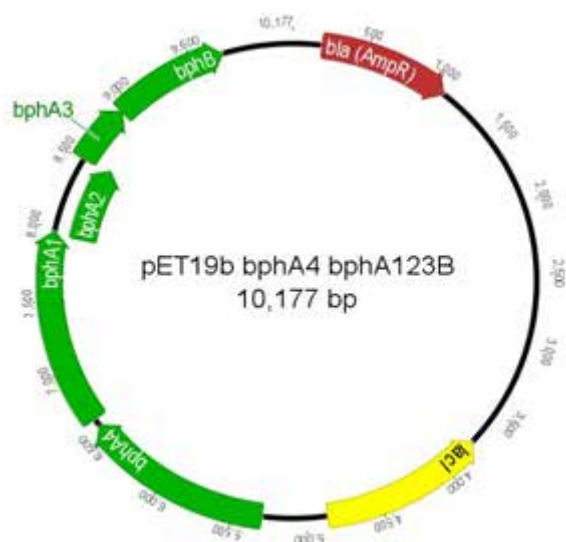


Рис. 3. Схема плазмиды pET19bbph (pET19bbphA4 bphA123B)

Таким образом, впервые создана модульная генетическая конструкция, содержащая стабильное репортерное слияние в хромосоме, позволяющая при этом

заменять гены *bph*-оперона, локализованные в плазмидном векторе, на гены, кодирующие бифенил 2,3-диоксигеназу, специфичную к другим конгенерам ПХБ. Схема экспериментальных работ по созданию плазмиды pET19bbphA4 bphA123B для экспрессии генов *bph*-оперона в клетках *E. coli* может быть представлена как последовательность следующих этапов: амплификация гена *bphA4* и генов *bphA123B* на матрице хромосомы *R. ruber* P25, клонирование полученных ампликонов в вектор pGEM-TEasy (Promega), секвенирование нуклеотидных последовательностей *bph*-генов с целью выявления клонов, не содержащих ошибок амплификации, перенос клонированных генов из pGEM-TEasy в экспрессионную плазмиду pET19b, трансформация итоговой плазмиды pET19bbph в клетки-репортеры, содержащие в составе хромосомы *clc::rfp* слияние.

#### Библиографический список

1. Eckhardt S., Breivik K., Mano S., Stohl A. Record high peaks in PCB concentrations in the Arctic atmosphere due to long-range transport of biomass burning emissions // *Atmospheric Chemistry and Physics*. – 2007. – Vol. 7. – P. 4527–4536.
2. Liu X., Germaine K.J., Ryan D., Dowling D.N. Whole-cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls // *Sensors*. – 2010. – Vol. 10. – P. 1377–1398.
3. Brazil G.M., Kenefick L., Callanan M., Haro A., de Lorenzo V., Dowling D.N., O’Gara F. Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph*-gene expression in the rhizosphere // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – № 5. – P. 1946–1952.
4. Liu X., Germaine K., Ryan D., Dowling D.N. Development of a GFP-based biosensor for detecting the bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) // *J. Environ. Eng. Landsc. Manag.* – 2007. – Vol. 15. – P. 261–268.
5. Liu X., Germaine K.J., Ryan D., Dowling D.N. Genetically modified *Pseudomonas* biosensing biodegraders to detect PCB and chlorobenzoate bioavailability and biodegradation in contaminated soils // *Bioengineered Bugs*. – 2010a. – Vol. 1(3). – P. 198–206.
6. Layton A.C., Muccini M., Ghosh M.M., Saylor G.S. Construction of a bioluminescent reporter strain to detect polychlorinated biphenyls // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – P. 5023–5026.
7. Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Разложение хлорированных бифенилов и продуктов их биоокисления штаммом *Rhodococcus* sp. В7а // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46. – № 6. – С. 644–650.
8. Плотникова Е.Г., Егорова Д.О., Демаков В.А. Использование бактерий-деструкторов для детоксикации стойких органических загрязнителей (полихлорированных бифенилов) // *Вестник РФФИ*. – 2012а. – Вып. 74. – № 2. – С. 82–94.
9. Плотникова Е.Г., Соляникова И.П., Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Головлева Л.А. Особенности разложения 4-хлорбифенила и 4-хлорбензойной кислоты штаммом *Rhodococcus ruber* P25 // *Микробиология*. – 2012б. – Т. 81. – № 2. – С. 159–170.
10. Baggi G., Bernasconi S., Zangrossi M., Cavalca L., Andreoni V. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents // *Int. Biodeter. Biodegrad.* – 2008. – Vol. 62. – № 1. – P. 57–64.
11. Eulberg D., Schlömann M. The putative regulator of catechol catabolism in *Rhodococcus opacus* 1CP- an IclR-type, not a LysR-type transcriptional regulator // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 1998. – Vol. 74(1-3). – P. 71–82.

DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR FOR DETECTING  
BIPHENYL/POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs) ON THE BASIS  
OF *bph*-GENES OF BACTERIA-DESTRUCTORS ISOLATED FROM  
ANTHROPOGENIC SOILS OF THE WESTERN URALS

E.S. Shumkova<sup>1,2</sup>, M.S. Shumkov<sup>1,2</sup>, E.S. Korsakova<sup>1</sup>, D.O. Egorova<sup>1</sup>,  
E.A. Shestakova<sup>1</sup>, E.G. Plotnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

<sup>2</sup> Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS

A specific genetic construct was created, which is actually a modified plasmid pET19b into which *bph*-operon (*bphA4*, *bphA123B*) genes of *Rhodococcus ruber* strain P25 were introduced under the control of a *T7-lac*-promoter. Intentionally induced synthesis of these protein molecules leads to the appearance of functional enzymes of "upper" biphenyl/PCBs degradation pathway in *E. coli* cytoplasm that provides the transformation of the pollutants to the *clc*-operon-inducing chemical compounds (*clc*-operon is responsible for chlorocatechol destruction). The *Clc*-genes of *R. opacus* ICP strain were placed into the *E. coli* chromosome as the basis of *clcRA::rfp* reporter fusion. The latter is the biosensor detection unit, which responds to the PCB degradation products and similar organic compounds.

In the course of the biosensor construction the whole genome sequencing of *R. ruber* strain P25 – an active destructor of biphenyl/PCBs – was carried out. Totally 3,677 genes were annotated (69.6%). The draft genome sequence was deposited in GenBank under NZ\_LDUF00000000.1 number. A gene cluster of biphenyl/chlorobiphenyl degradation was identified. The *bph*-operon structure of the P25 strain appeared to be different in comparison with that of known bacteria-destructors of biphenyl/PCBs: *bhRorf2orf1A4DCA1A2A3B*. The transcription of *orf1* and *orf2* loci is performed in the opposite direction with *bphR* and *bphA4DCA1A2A3B*.

**Keywords:** whole-cell biosensor, polychlorinated biphenyls, biphenyl degradation genes, genetic construct.

**Сведения об авторах**

*Шумкова Екатерина Сергеевна*, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; научный сотрудник лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов, Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН), 119071, г. Москва, Ленинский пр., 33, стр. 2; e-mail: ekaterinash80@mail.ru

*Шумков Михаил Сергеевич*, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; научный сотрудник лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов, Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН; e-mail: shumkovm@gmail.com

*Корсакова Екатерина Сергеевна*, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: korsakovaekaterina08@gmail.com

*Егорова Дарья Олеговна*, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: daryao@rambler.ru

*Шестакова Елена Анатольевна*, инженер, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: she-lena1@yandex.ru

*Плотникова Елена Генриховна*, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: peg\_el@mail.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.