



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71729** (13) **U**

(51) МПК (2012.01)

**C12Q 1/00****C12Q 1/02** (2006.01)**C12Q 1/04** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**(21) Номер заявки: **u 2012 00140**(22) Дата подання заявки: **04.01.2012**(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.07.2012**(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.07.2012, Бюл.№ 14**

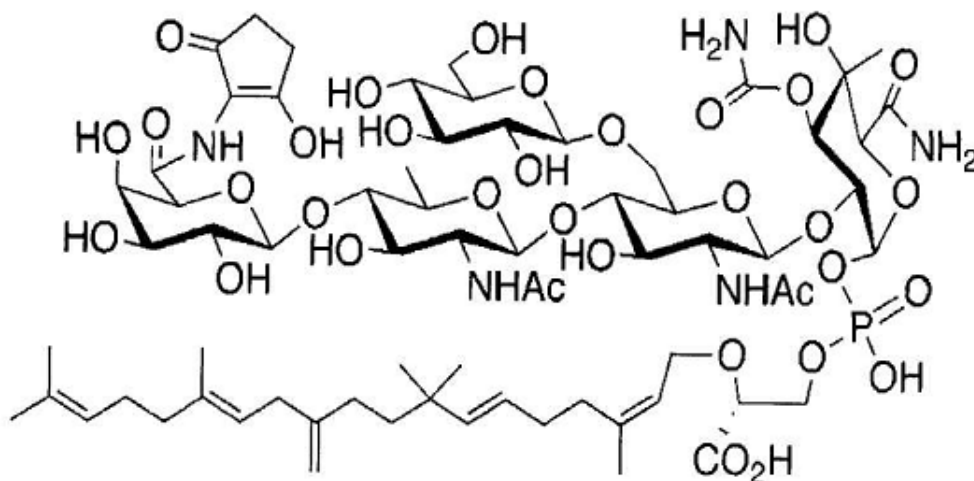
(72) Винахідник(и):

**Рабик Марія Василівна (UA),  
Осташ Богдан Омелянович (UA),  
Федоренко Віктор Олександрович (UA)**

(73) Власник(и):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА,  
вул. Університетська, 1, м. Львів, 79000,  
Україна (UA)****(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ БІОСИНТЕЗУ АНТИБІОТИКІВ МОЕНОМІЦИНОВОГО РЯДУ****(57) Реферат:**

Спосіб підвищення біосинтезу антибіотиків моеноміцинового ряду базується на спрямованому руйнуванні негативних регуляторів. Крім того, як ген-регулятор для руйнування використовують ген *wblA<sub>gh</sub>* *S. ghanaensis*.



Фіг. 1

UA 71729 U



Корисна модель належить до генетики бактерій та біотехнології і може бути використана для створення штамів актиноміцетів-надпродуцентів антибіотиків моеноміцинового ряду та їхніх похідних.

Відомий спосіб отримання надпродуцентів моеноміцинів, згідно з яким спорову суспензію *Streptomyces ghanaensis* - продуцента моеноміцинів - опромінюють ультрафіолетом чи обробляють хімічним мутагеном, розсівають її на поживному агаризованому середовищі та відбирають клони із підвищеним рівнем біосинтезу антибіотика [Subramaniam-Niehaus B., Schneider T., Metzger J.W., Wohlleben W. Isolation and analysis of moenomycin and its intermediates from *Streptomyces ghanaensis* (ATCC14672) wildtype and selected mutants // Z. Naturforsch. - 1997. - vol.52. - P. 217-226; Schuricht U., Hennig L., Findeisen M., Endler K., Welzel P., Arigoni D. The biosynthesis of moenocinol, the lipid part of the moenomycin antibiotics // Tetrahedron Lett. - 2001. - vol. 42. - P. 3835-3837]. Отримані мутанти синтезують у 2-2,5 рази більше моеноміцинів порівняно з вихідним штамом.

Проте зазначений спосіб є досить тривалим, включає застосування складних мікробіологічних процедур. Мутації, що накопичуються у штамів, є унікальними для кожного з них і тому їх неможливо відтворити в іншому штамі, що продукує структурно відмінний моеноміцин.

Найближчим за технічною суттю прототипом, є спосіб підвищення рівня синтезу доксорубіцину та даунорубіцину штамом *S. peucetius* 01M за допомогою руйнування гена *wblA<sub>spe</sub>*, який кодує плейотропний регулятор біосинтезу антибіотиків та морфологічної диференціації [Noh J.-H., Kim S.-H., Lee H.-N., Lee S.Y., Kim E.-S. Isolation and genetic manipulation of the antibiotic down-regulatory gene, *wblA* ortholog for doxorubicin-producing *Streptomyces* strain improvement // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2010. - vol. 86. - P. 1145-1153]. Косміду, яка містить зруйнований ген *wblA<sub>spe</sub>* введено у штам *S. peucetius* 01M за допомогою кон'югації з *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002). Після інкубування при 30 °C протягом 16 год., кожен чашку Петрі з кон'югаційною сумішшю заливали 1 мл стерильної води, яка містить 50 мкг/мл апраміцину та 25 мкг/мл налідиксової кислоти. Інкубацію продовжували до появи екскон'югантів. Мутанти, в яких відбулося заміщення гена *wblA<sub>spe</sub>* на ген стійкості до канаміцину, відбирали за ознаками стійкості до апраміцину та чутливості до канаміцину. Нокаут гена підтверджували за допомогою ПЛР. Транскон'юганти вирощували протягом двох днів у рідкому середовищі TSB, потім протягом 6 днів у середовищі NDYE. Доксорубіцин та даунорубіцин екстрагували сумішшю ізопропілового спирту та 30 % HCl (50:1), центрифугували 10 хв при 15 000 об./хв., отриманий супернатант аналізували за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Транскон'юганти продукували у 1,5 рази більше даунорубіцину та у 0,4 рази більше доксорубіцину, ніж контрольний штам.

Проте, штам *S. peucetius* не продукує моеноміцинів і, тому цей штам і клонований ген *wblA<sub>spe</sub>* не можна використати для підвищення продукції останніх.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб підвищення біосинтезу антибіотиків моеноміцинового ряду шляхом руйнування гену негативного регулятора *wblA<sub>gh</sub>*, у актиноміцетній культурі *S. ghanaensis*, що дасть змогу підвищити вихід продукції антибіотика.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі підвищення біосинтезу антибіотиків моеноміцинового ряду, який базується на спрямованому руйнуванні негативних регуляторів, при чому, як ген-регулятор для руйнування використовують ген *wblA<sub>gh</sub>* *S. ghanaensis*.

Моеноміцини - це фосфогліколіпідні антибіотики, активні проти широкого спектра грам-позитивних бактерій. Ці сполуки виявляють інгібуючу дію за наномолярних концентрацій, є значно активніші, ніж, зокрема, ванкоміцин [Ostash B., Saghatelian A., Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // Chem. Biol. - 2007. - vol. 14. - P. 257-267].

Відомо, що моеноміцини - єдині відомі сполуки, які інгібують ріст бактерій шляхом безпосереднього зв'язування з пептидоглікан-глікозилтрансферазами - ферментами, які формують гліканові ланцюги бактерійної клітинної стінки із дисахаридних попередників [Ostash B., Walker S. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, biological activity // Nat. Prod. Rep. - 2010. - vol. 27. - P. 1594-1617].

Проте, існуючі штами-продуценти моеноміцинів синтезують малі кількості антибіотика, що є перешкодою для дослідження антибіотика та його похідних.

Авторами вперше запропоновано використати нокаут гена *wblA<sub>gh</sub>* для підвищення виходу продукції моеноміцинових антибіотиків. Ген *wblA<sub>gh</sub>* кодує плейотропний регулятор синтезу антибіотиків та задіяний у морфогенезі.

Оскільки, делеції генів негативних регуляторів дають змогу швидко отримувати штами, які продукують збільшену кількість антибіотиків, то це призведе до підвищення виходу продукції антибіотиків моеноміцинового ряду.

Фіг. 1 Хімічна будова моеноміцину А, основного представника антибіотиків моеноміцинового ряду.

Фіг. 2 Результати аналізу продукції моеноміцинів штамами за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, спряженої з мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС), де:

1 - рівень продукції моеноміцинів штамом *S. ghanaensis* ATCC 14672;

2 - рівень продукції моеноміцинів штамом *S. ghanaensis* ΔwblAgh.

Спосіб можна проілюструвати прикладами:

Конструюють плазмиду pCwblAgh-нео. Спершу, для конструювання плазмиди pUCwblAgh, фрагмент ДНК із хромосоми *S. ghanaensis*, який містить ген wblA<sub>gh</sub> ампліфікують за допомогою праймерів wblA-gh-up (5'-AAATCTAGACACGTAGTCGCAGAAGAATC-3') та wblA-gh-rev (5'-AAAGAATTCTGACATCGATCCACTGATCGA-3'). Отриманий, фрагмент розміром 3,5 т.п.н. клонують у вектор pUC57, який обробляють ендонуклеазою рестрикції EcoRV та лігують з вищеописаним ампліфікованим фрагментом. Лігазною сумішшю трансформують штам *E. coli* DH5α та відбирають клони, що несуть рекомбінантні плазмиди на середовищі LA з 25 мкг/мл апраміцину, 65 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-індоліл-β-D-галактозиду та 30 мкг/мл ізопропілтіогалактозиду. Плазмідну ДНК із трансформантів аналізують рестрикційним картуванням ферментами HindIII та EcoRI [Гловер Д. Молекулярное клонирование ДНК. Методы. М., Мир - 1989 - т. 1 - 374 с.]. Отриману плазмиду позначають pUCwblAgh. Плазмидою pUCwblAgh трансформують штам *E. coli* BW25113, що містить плазмиду pIJ790 з red-генами фага λ під контролем індукцйбельного промотора P<sub>BAD</sub> [Gust B., Chandra G., Jakimowicz D., Yuqing T., Bruton C.J., Chater K.F. Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Adv. Appl. Microbiol. - 2004. - vol. 54. - P. 107-128].

З плазмиди pKD4 [Datsenko K., Wanner B.L.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - vol. 97. - P. 6640-6645] за допомогою мегапраймерів wblA-gh-p1 (5'-TTCGTTTCAGGGAGCAGCGCAGAACAGG GCCAAGGCGGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3') та wblA-gh-p2 (5'-GACCCCCGCGGGTGACCGAGGACCCCTGAGGAACCCTCACATATGAA TATCCTCCTTAG-3') ампліфікують фрагмент ДНК розміром 1.6 т.п.н., що містить ген стійкості до канаміцину нео. Праймери підбирають так, щоб вони склалися з двох частин: перші 39 п.н. гомологічні до послідовності ДНК, що оточує ген wblAgh та містять start- і стоп-кодони гена, наступні 20 – ділянки P1I та P2 - до гена канаміцин-стійкості нео. В результаті ампліфікований фрагмент ДНК містить ген нео, 5'- і 3'-кінці якого містять по 39 п.н. гомологічних до послідовностей, які фланкують ген wblA<sub>gh</sub>. Цей лінійний фрагмент ДНК трансформують за допомогою електропорації у клітини *E. coli* BW25113 (pIJ790; pUCwblAgh). Для цього *E. coli* BW25113 (pIJ790; pUCwblAgh) вирощують протягом 18 год. при 30 °C в 10 мл середовища 2xYT [Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // J. Mol. Biol. - 1983. - vol. 166. - P. 557-580], яке містить 25 мкг/мл хлорамфеніколу та 100 мкг/мл ампіциліну. 150 мкл культури *E. coli* BW25113 (pIJ790; pUCwblAgh), вирощеної вночі протягом 12 год., инокулюють у 15 мл середовища 2xTY з 25 мкг/мл хлорамфеніколу та 100 мкг/мл ампіциліну, додають 150 мкл 1 M L-арабінози. Культуру вирощують до оптичної густини OD<sub>600</sub>≈0,4 протягом 3-4 год., переносять у пробірки з об'ємом 15 мл та осаджують центрифугуванням при 4 тис. об./хв протягом 10 хв. Зливають супернантант та клітини ресуспендують в 1 мл охолодженої дистильованої води. Центрифугують клітини протягом 30 сек., та повторюють промивання клітин холодною водою ще два рази. На четвертий раз клітини промивають у 1 мл охолодженого 10 % гліцеролу та ресуспендують у 100 мкл 10 % гліцеролу. 50 мкл отриманої суспензії клітин змішують із 1-2 мкл ПЛР продукту (ген нео) та переносять у кювету для елетропорації з відстанню між електродами 1мм. Елетропорацію здійснюють на приладі BTX Electroporator ECM 630 із такими параметрами: опір - 200 Ом, ємність - 25 мкФ, напруга - 1,8 кВ. Після електричного розряду негайно додають 1 мл охолодженого середовища 2xTY до кювети і інкубують її протягом 3 год. при 37 °C та висівають на чашки з середовищем LA з 100 мкг/мл ампіциліну та 50 мкг/мл канаміцину. Чашки інкубують при 37 °C 16 год. після чого трансформанти пересівають на свіже середовище LA з 50 мкг/мл канаміцину. Плазмідну ДНК із трансформантів - аналізують рестрикційним картуванням ферментом PstI. Отриману плазмиду, позначену pUCwblAgh-нео, обробляють ендонуклеазами рестрикції HindIII та EcoRI. Вектор pKC1139 [Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. - 2000. - 613 pages] обробляють ендонуклеазами рестрикції HindIII та EcoRI та лігують з вищеописаним фрагментом, що містить зруйнований ген wblA<sub>gh</sub>. Лігазною сумішшю

трансформують *E. coli* DH5 $\alpha$  та відбирають клони, що несуть рекомбінантні плазмиди на середовищі LA з 25 мкг/мл апраміцину, 65 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-індоліл- $\beta$ -D-галактозиду та 30 мкг/мл ізопропілтіогалактозиду. Плазмідну ДНК із трансформантів аналізують рестрикційним картуванням ферментами HindIII та EcoRI.

Отриманою плазмідною pKCwblAgh-neo трансформують штам *E. coli* ET12567 (pUB307), який за рахунок tra-генів плазмиди pUB307 забезпечує кон'югативне перенесення корезидентних плазмід [Flett F., Mersinias V., Smith C.P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl-DNA-restricting *Streptomyces* // FEMS Microbiol. Lett. - 1997. - vol. 155. - P. 223-229]. Одну колонію культури *E. coli* ET12567 (pUB307), вирощеної вночі протягом 12 год., засівають у 10 мл середовища LB з 50 мкг/мл канаміцину. Культуру вирощують до оптичної густини OD<sub>600</sub>≈0,1, переносять у мікропробірки з об'ємом 1,5 мл та осаджують центрифугуванням при 8 тис. об./хв протягом 1 хв. Зливають супернантант та клітини ресуспендують у 50 мкл середовища LB. Отриману суспензію клітин охолоджують у льоді 5 хв, додають 1 мл 0,1M розчину CaCl<sub>2</sub> та інкубують у льоді 1 год. Клітини осаджують центрифугуванням при 8 тис. об./хв протягом 1 хв, зливають надосадову рідину та ресуспендують у 100 мкл 0,1M розчину CaCl<sub>2</sub>. Інкубують 1 год. у льоді та додають розчин плазмідної ДНК. Інкубують 1 год. у льоді, після чого клітини піддають тепловому шоку протягом 1 хв при 40 °C, охолоджують та додають 1 мл середовища LB. Інкубують 2 год. при 37 °C для індукції експресії генів стійкості та висівають на чашки з середовищем LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину. Чашки інкубують при 37 °C 16 год. після чого трансформанти пересівають на свіже середовище LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину.

Плазмиду pKCwblAgh-neo в *S. ghanaensis* переносять шляхом міжродової кон'югації з відповідним штамом *E. coli* ET12567 (pUB307; pKCwblAgh-neo). Суспензію спор штаму *S. ghanaensis* висівають на середовище OM г/л: вівсяне борошно - 30, агар - 18, вода водопровідна - до 1 л, pH до стерилізації - 7,0 та вирощують 7 діб при 28 °C для отримання спорової суспензії для кон'югаційних схрещувань. Штам *E. coli* ET12567 (pUB307; pKCwblAgh-neo) висівають на чашку з середовищем LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину та вирощують 18 год. при 37 °C. Готують суспензію клітин в 1 мл середовища LB. Одночасно готують суспензію спор штаму *S. ghanaensis* в 1 мл стерильної води. Спори піддають тепловому шоку протягом 10 хв. при 50 °C. Суспензію клітин та спор стрептоміцетів осаджують центрифугуванням 2 хв. при 8 тис. об./хв., зливають надосадову рідину, розчиняють у 100 мкл середовища LB, змішують між собою та висівають на чашки з середовищем OM. Чашки інкубують 20 год. при 28 °C та заливають 1 мл водного розчину 25 мкг апраміцину та 50 мкг налідиксової кислоти.

Отриманий штам *S. ghanaensis* (pKCwblAgh-neo) перевіряють на наявність плазмиди. Вирощують у 15 мл рідкого середовища TSB та виділяють сумарну ДНК, зразками якої трансформують штам *E. coli* DH5a [Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. - 2000. - 613 pages]. Плазмідну ДНК з трансформантів аналізують рестрикційним картуванням ферментами PstI, HindIII, EcoRI.

Отриманий апраміцин-стійкий транскон'югант *S. ghanaensis* (pKCwblAgh-neo) містить цю плазмиду в автономному стані. Для того, щоб плазмиди інтегрувалася за гомологією у хромосому *S. ghanaensis*, вирощують рідку культуру штаму *S. ghanaensis* (pKCwblAgh-neo) без антибіотика у середовищі TSB при температурі 40 °C протягом 6 діб. Потім 100 мкл рідкої культури транскон'юганта висівають на середовище LA з 50 мкг/мл канаміцином. Відбирають один апраміцин-стійкий та канаміцин-стійкий клон і здійснюють його триразовий пересів за неспецифічних умов у середовищі TSB для стимуляції проходження вторинного кросингверу. 100 мкл рідкої культури після пересівів висівають на чашки з середовищем OM та за допомогою методу реплік відбирають клони з вторинним кросингвером за ознакою чутливості до апраміцину, як наслідок втрати послідовностей вектора. Один із таких клонів позначено *S. ghanaensis*  $\Delta$ wblAgh і використано для дальшого аналізу.

Перевіряють рівень продукції моюноміцинів мутантним штамом *S. ghanaensis*  $\Delta$ wblAgh. Штам висівають у 15 мл середовища TSB та вирощують протягом 2 діб при 30 °C. 1 мл пре-культури інокулюють у 50 мл середовища TSB та вирощують протягом 5 діб при 30 °C. Біомасу з 50 мл середовища концентрують центрифугуванням і промивають дистильованою водою. До біомаси додають 0,5 мл води та 7-8 мл метанолу. Суміш ретельно гомогенізують та інкубують при температурі 37 °C протягом 12 год.

Для отримання напівочищених зразків моюноміцинів для ВЕРХ-МС сирцевий екстракт очищують за допомогою твердофазних колонок Alltech C18 - 100 мг смоли-носія - згідно з такою

схемою: а) активація колонки - 1 мл метанолу, потім 1 мл деіонізованої води; б) нанесення зразка - 2 мл; в) промивка колонки - 1 мл води, 1 мл суміші етилацетат: метанол у співвідношенні 3: 1; г) елювання моеноміцинів - 1,5 мл метанолу. Отриманий елюат висушують у вакуумній сушці SpeedVac, сухий залишок розчиняють у 150 мкл води з 0,1 % гідроксиду амонію, 20 мкл розчину використовується для ВЕРХ-МС. Таким чином отримують зразки моеноміцинів, на Фіг. 1 показано будову молекули моеноміцину А - основного представника антибіотиків моеноміцинового ряду.

Для ВЕРХ-МС використовують прилади Agilent 1100 LC/MSD ESI, Agilent 1150 LC/MSD TOF та Agilent 6520 Accurate-Mass qTOF LC-MS. Система розчинників: розчин А - вода + 0,1 % гідроксид амонію, розчин Б - ацетонітрил + 0,1 % гідроксид амонію. Як нерухому фазу використовують хроматографічні колонки різного розміру та виробництва з носієм C<sub>18</sub> (Agilent, Phenomenex, Waters). У всіх випадках колонки термостатують (30 °C). Типова програма розділення моеноміцинів: (час, хв - % розчину Б): 0-25, 1,0-25, 10,0-95, 14,0-95, 14,1-25, 20,0-10. За таких умов моеноміцини з повнорозмірним ліпідним ланцюгом 25 карбонів виходять з колонки у районі 10-11 хв. Зразки аналізують у режимі негативної іонізації скануванням аніонів у діапазоні 300-1700 Да. Напруга капіляру становить 4 кВ, фрагментора - 150 В. Температура газів просушування - 300 °C, швидкість потоку - 7 л/хв., тиск на короні розряду - 4 атм/см<sup>2</sup>.

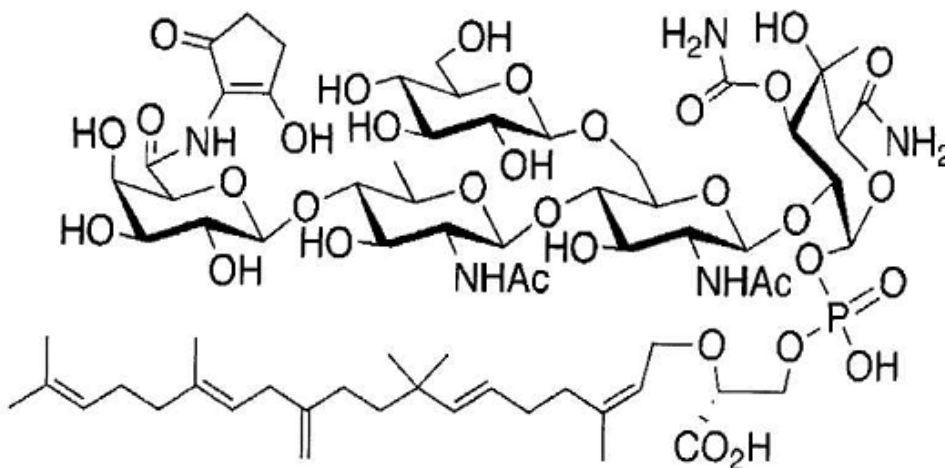
При проведенні дослідів використовували: для визначення температури - ртутний термометр з похибкою показів  $\pm 0,5$  °C; об'єму рідин - мірні циліндри з похибкою показів  $\pm 0,5$  мл та лабораторні дозатори з похибкою показів  $\pm 0,05$ -0,5 мкл; маси речовин - аналітичну вагу "Sartorius" з похибкою показів  $\pm 0,00005$  г та лабораторну вагу AXIS з похибкою показів  $\pm 0,05$  г; час - електронним годинником з похибкою показів  $\pm 0,5$  сек.

Для кількісного аналізу продукції моеноміцинів площі мас-пиків досліджуваних сполук інтегрують і нормалізують відносно однакової кількості біомаси - сухої ваги. Експеримент повторюють тричі і визначають середнє значення, похибку та стандартне відхилення а.

Результати експериментів відображено на Фіг. 2, де: 1 - рівень продукції моеноміцинів штамом *S. ghanaensis* ATCC 14672; 2 - рівень продукції моеноміцинів штамом *S. ghanaensis* ΔwblA<sub>gh</sub>. Мутантний штам продукує у середньому 2,3 раза більше моеноміцинів:  $7 \pm 1$  мкг/л ферментаційного середовища, ніж контрольний штам -  $3 \pm 1$  мкг/л ферментаційного середовища, що підтверджує отримання передбачуваного результату.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб підвищення біосинтезу антибіотиків моеноміцинового ряду, який базується на спрямованому руйнуванні негативних регуляторів, який **відрізняється** тим, що, як ген-регулятор для руйнування використовують ген wblA<sub>gh</sub> *S. ghanaensis*.



Фіг. 1

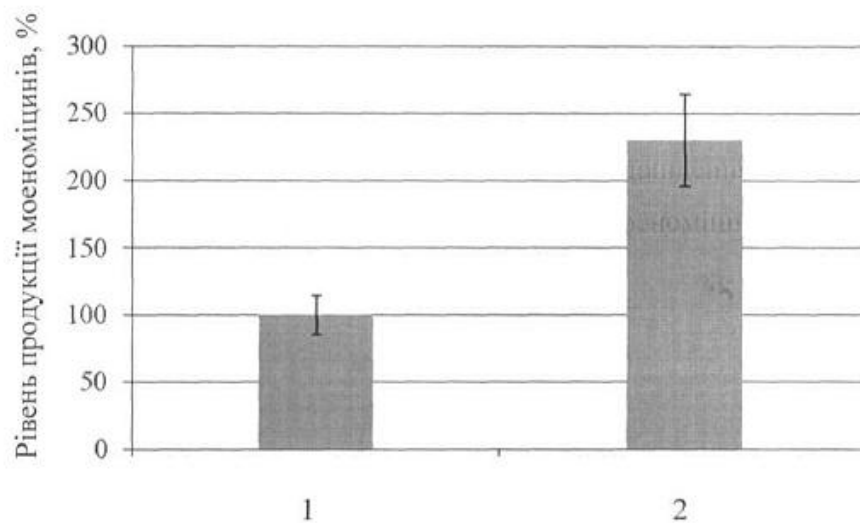


Fig. 2

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601