

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА»
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



БУБНОВ
Дмитрий Михайлович

**ИНСТРУМЕНТЫ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ
ESCHERICHIA COLI И ДРУГИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
ПОРЯДКА *ENTEROBACTERIALES***

Специальности: 1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Нетрусов Александр Иванович

Москва 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Открытие Red-зависимой гомологичной рекомбинации бактериофага λ	16
1.2 Сравнение Red- и RecABCD-путей гомологичной рекомбинации.....	17
1.3 Белки в составе системы λ Red	19
1.3.1 Экзонуклеаза λ Exo	19
1.3.2 λ Beta.....	20
1.3.3 λ Gam	23
1.4 Предполагаемые механизмы Red-зависимой гомологичной рекомбинации....	24
1.4.2 RecA-независимый путь Red рекомбинации.....	26
1.4.1 RecA-зависимый путь Red рекомбинации.....	28
1.5 λ Red – инструмент редактирования генома <i>Escherichia coli</i>	29
1.5.1 Методы, предшествующие λ Red	29
1.5.2 λ Red-рекомбиниринг.....	31
1.5.3 Параметры, влияющие на эффективность рекомбинации	34
1.5.4 Области применения технологии λ Red.....	35
1.5.5 Стратегии удаления селективного маркера и негативная селекция	40
1.5.6 Ограничения λ Red-рекомбиниринга	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1 Среды и реагенты	47
2.2 Ферменты и наборы	48
2.3 Олигонуклеотиды.....	48
2.4 Бактериальные штаммы и плазмиды.....	48
2.5 Приготовление электрокомпетентных клеток	56
2.6 Электропорация.....	57
2.7 Получение интегративных кассет	57
2.8 λ Red-зависимая интегративная трансформация	62

2.9 Интеграция посредством негативной селекции <i>cI-hok</i> и идентификация рекомбинантов.....	62
2.10 Измерение эффективности интеграции ПЦР-продуктов.....	65
2.11 Измерение стабильности репликации и эффективности удаления плазмид ..	65
2.12 Оценка способности штаммов к накоплению аминокислот.....	66
2.13 Удаление вспомогательных плазмид	67
2.14 Измерение скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать в условия негативной селекции.....	67
2.15 Измерение эффективности высева фага λ	68
2.16 Измерение роста клеток и <i>in vivo</i> люминисценции	69
2.17 Перенос немаркированных геномных локусов между штаммами.....	70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	73
3.1 Создание вспомогательных конструкций для экспрессии генов Red.....	73
3.2 Интеграция фрагментов ДНК без селекции	82
3.3 Негативная селекция <i>cI-hok</i> и интеграции протяжённых конструкций с её помощью.....	86
3.3.1 Стратегия негативной селекции	86
3.3.2 Оценка эффективности негативной селекции <i>cI-hok</i>	92
3.3.3 Подавление активности эндонуклеазы EcoKI облегчает интеграцию конструкций, синтезированных с помощью ПЦР	95
3.3.4 Анализ спонтанных мутаций, позволяющих выживать в условиях негативной селекции <i>cI-hok</i>	99
3.3.5 Интеграция гетерологичных конструкций в бактериальную хромосому при помощи негативной селекции <i>cI-hok</i>	105
3.3.6 Негативная селекция <i>cI-hok</i> в сочетании с λ Red-рекомбинацией – удобный инструмент для задач метаболической инженерии.....	111
3.3.7 Перенос немаркированных геномных локусов между штаммами с помощью негативной селекции <i>cI-hok</i>	115
3.3.8 Адаптация негативной селекции <i>cI-hok</i> и λ Red-рекомбинации к немодельным энтеробактериям.....	118

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	124
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	126
ПРИЛОЖЕНИЯ	146
Приложение 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе.....	146
Приложение 2. Конструирование штаммов, использованных в работе.....	151

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

E. coli – *Escherichia coli*

OD₆₀₀ – оптическая плотность при длине волны 600 нм

λRed – система гомологичной рекомбинации бактериофага λ

5'-UTR – 5'-нетранслируемая область

RBS – сайт посадки рибосомы

(т.)п.н. – (тысяч) пар нуклеотидов

онДНК – однонитевая ДНК

днДНК – двунитевая ДНК

нг – нанограмм

мкг – микрограмм

ПЦР – полимеразная цепная реакция

АТФ – аденозинтрифосфат

IPTG - изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

Ap^R – устойчивость к ампициллину

Clm^R – устойчивость к хлорамфениколу

Sm^R – устойчивость к стрептомицину

Tet^R – устойчивость к тетрациклину

Suc^S – чувствительность к сахарозе, вызванная геном *sacB*

Lac⁻ – неспособность к утилизации лактозы

Gal⁻ – неспособность к утилизации D-галактозы

Ara⁻ – неспособность к утилизации L-арабинозы

Scr⁺ - способность к утилизации сахарозы

ts – мутация, следствием которой является температурная нестабильность белка (или мутант, неспособный расти при повышенной температуре)

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития системы биологического знания подавляющее большинство исследований выполняются модельных организмов, таких как, например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster*. Данные объекты отличаются от прочих простотой организации и высокой скоростью размножения и легко поддаются культивированию в лабораторных условиях. Помимо этого, на выбор объекта исследований влияют объем накопленных знаний о его биологии. В частности, сейчас особенно важно наличие полной собранной последовательности геномной ДНК. По причине того, что все организмы имеют ту или иную степень родства друг с другом, закономерности, открытые на модельных объектах, могут быть экстраполированы на широкий круг родственных организмов.

Среди модельных объектов биологических исследований особое положение занимает *Escherichia coli* (*E. coli*). Работа с этим микроорганизмом и его бактериофагами привела к многим триумфальным открытиям в биологии. Так, заражая клетки *E. coli* радиоактивно меченым бактериофагом Т2, Херши и Чейз в 1952 году впервые доказали, что носителем наследственности является ДНК, а не белки (Hershey et al., 1952). В 1958 году Мезельсон и Сталь в опытах с ДНК, меченой тяжелым изотопом азота, доказали полуконсервативный механизм репликации хромосомальной ДНК *E. coli* (Meselson et al., 1958). Сеймур Бензер попарно скрещивал между собой в клетках *E. coli* тысячи мутантных по локусу *rII* штаммов бактериофага Т4. В результате этой работы он в 1961 году доказал линейную структуру гена, а также показал, что наименьшей единицей генетической рекомбинации является отдельные пары нуклеотидов, а не целые гены, как считалось ранее (Benzer, 1961). В дальнейшем разработанная Бензером модельная система была использована для доказательства триплетной структуры генетического кода. Крик, Барнетт и Бреннер исследовали природу мутаций в локусе *rII*, вызванных интеркалирующим мутагеном профлавином. Они обнаружили, что данные мутации вызывают сдвиг рамки считывания гена.

Комбинируя полученные мутации между собой, они показали, что код триплетен (Crick et al., 1961). Ниренберг и Маттей в экспериментах с гомополимерными молекулами РНК и внеклеточной системой трансляции, полученной из клеток *E. coli*, положили начало работе по расшифровке генетического кода (Nirenberg et al., 1961), которая была закончена позже в соавторстве с Ледером (Leder et al., 1964). Жакоб и Моно на модели *E. coli* исследовали регуляцию синтеза ферментов, необходимых для утилизации лактозы. В результате их работы были сформированы понятия оперона, гена-репрессора, оператора, а также появилось представление о короткоживущем посреднике между генами и белками, в последующие годы идентифицированном как мРНК (Jacob et al., 1961). Оперон *lacZYA* и его отдельные функциональные части до сих пор используются учеными как удобный инструмент в широком круге задач.

Выше были перечислены лишь наиболее известные и значимые открытия в биологии, сделанные на *E. coli*, но справедливые для всех живых организмов. Позднее на примере этого организма были продолжены работы по исследованию функционирования генетического аппарата клетки. Были детально изучены механизмы репликации генетического материала и регуляции транскрипции генов. Исследование трансляционного аппарата *E. coli* оказало существенное влияние на понимание механизма синтеза белка в клетке. Кроме того, *E. coli* послужила основной моделью в изучении механизмов гомологичной и сайт-специфической рекомбинации, биологии мобильных генетических элементов и бактериофагов. Исследование транспозонов, а также путей обмена генетической информацией между клетками путем конъюгации, трансформации и трансдукции тесно связано с проблемой устойчивости к антибиотикам. Изучение механизмов этого явления, а также механизмов образования биопленок, систем токсин-антитоксин и персистенции имеет важнейшее значение для медицинской микробиологии на фоне кризиса в области лечения бактериальных инфекций, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

На примере *E. coli* было расшифровано большинство путей ассимиляционной и диссимиляционной ветвей клеточного метаболизма, по

крайне мере тех, что свойственны хемоорганогетеротрофным организмам (большинство из которых используются, так или иначе, всеми организмами). Помимо этого, на данный момент известны детали генетического контроля путей метаболизма, а также механизмы регуляции экспрессии генов, контролирующей синтез тех или иных ферментов. По этой причине *E. coli* в последние 30-40 лет стала ключевым объектом в микробной биотехнологии. На основе этого микроорганизма были сконструированы продуценты ценных органических соединений, среди которых сукцинат, L-лизин, L-треонин, L-триптофан и L-фенилаланин. *E. coli* используют как организм-хозяин для получения рекомбинатных белков, таких как человеческий инсулин, человеческий гормон роста, ряд интерферонов, а также многих других.

Возникает закономерный вопрос, по какой причине *E. coli* заняла такое важное место как удобная модель для исследований? Ответ состоит в том, что *E. coli* как ни один другой организм подходит под перечисленные выше критерии модельного объекта. *E. coli* растет как на богатых, так и на минеральных средах. Культивирование этого объекта не требует сложного и дорогостоящего оборудования. Время генерации в оптимальных условиях составляет всего 20 минут, что позволяет получить результаты эксперимента всего через 12 часов после его начала (часто в течение одного рабочего дня). В 1997 году штамм *E. coli* K-12 MG1655 стал первым организмом, чей геном был полностью секвенирован и опубликован для свободного доступа (Blattner et al., 1997). К настоящему моменту экспериментально показаны функции около 75% генов (Keseler et al., 2017), что делает *E. coli* наиболее подробно изученным живым организмом. Существенный вклад в достижение этого результата внесла масштабная работа по получению фенотипически охарактеризованной библиотеки нокаутных штаммов Keio Collection (Baba et al., 2006), а также плазмидной библиотеки оверэкспрессий большинства генов Aska Library (Kitagawa et al., 2005).

Кроме того, что на данный момент *E. coli* – самый изученный живой организм, наилучшим образом соответствующий требованиям к модельным объектам, этот микроорганизм занял свое место в биологической науке по

причине наличия широкого спектра культуральных, биохимических и генетических методов. Нельзя однозначно утверждать, привела ли популярность объекта к разработке методологии, или же связь носит обратный характер. Тем не менее, сейчас исследователи выбирают в качестве модели *E. coli* во многом потому, что на этом объекте могут быть выполнены работы, намного более технически сложные, чем на других организмах. Среди прочих, к таким работам можно отнести эксперименты по созданию искусственных схем регуляции экспрессии генов, подобных по архитектуре и свойствам вычислительным устройствам (Brophy et al., 2014) и эксперименты по конструированию штаммов с редуцированным геном (Mizoguchi et al., 2008). Отдельно следует отметить цикл работ, в результате которых путём внесения направленных модификаций и лабораторной эволюции были созданы штаммы *E. coli*, способные, подобно автотрофным организмам, получать весь углерод в ходе ассимиляции CO₂ в восстановительном пентозофосфатном пути (Antonovsky et al., 2016; Gleizer et al., 2019; Flamholz et al., 2020).

Важнейшее значение для работы с объектом имеют методы модификации генетического материала клетки. Так, например, не имея в руках инструментов, позволяющих инактивировать ген, повысить уровень его экспрессии или получить мутантный аллель с измененными свойствами, невозможно выполнить рядовое исследование генетического контроля какого-либо фенотипического признака или процесса жизнедеятельности клетки. Поэтому, во многом благодаря наличию развитого генно-инженерного инструментария *E. coli* используется в качестве модели для изучения метаболизма и молекулярных механизмов функционирования клеточных систем. Для *E. coli* доступны эффективные методы трансформации клеток экзогенной ДНК, методы химического и инсерционного мутагенеза, фаговые и плазмидные вектора с различным числом копий и кругом хозяев, широкий набор маркеров устойчивости к антибиотикам. Среди способов модификации геномных мишеней ключевое место занимает метод, использующий систему гомологичной рекомбинации Red бактериофага λ (λRed). Впервые использованный для конструирования рекомбинантных штаммов в 1998

году (Murphy, 1998), на данный момент этот метод произвел настоящую революцию в работе с *E. coli*, многократно упростив и ускорив любые манипуляции с геномом. Многие исследования, в том числе и упомянутые выше работы по редукции генома и получению библиотеки нокаутных штаммов стали возможны лишь с использованием λ Red. Более того, этот метод был адаптирован для модификации сегментов хромосом высших организмов в клетках *E. coli* (Muyrers, 1999; Copeland et al., 2001; Lee et al., 2001). Совокупность методов генетической инженерии с использованием системы рекомбинации λ Red, получившая название «рекомбини́нг» (recombineering, от «recombination-mediated genetic engineering»), активно развивается уже на протяжении 25 лет. По причине того, что рекомбини́нг получил широкое признание и стал незаменимым инструментом для исследователей, работающих с *E. coli* и другими объектами, его техническое исполнение совершенствуется, а также расширяется спектр задач, в которых он может применяться. Тем не менее, эта технология имеет несколько ограничений, не позволяющих использовать её в качестве единственного и универсального метода для инженерии генома *E. coli*. В частности, основным ограничением λ Red считается отсутствие удобных и эффективных подходов для интеграции фрагментов ДНК длиной более ~4,0 т.п.н. (Kuhlman et al., 2010; Maresca et al., 2010), что вынуждает использовать более сложные в техническом исполнении и трудоёмкие стратегии.

Актуальность работы обусловлена возрастающим числом задач в области метаболической инженерии микроорганизмов и синтетической биологии, требующих расширения метаболических возможностей клетки в результате привнесения гетерологичных метаболических путей и интеграции контролируемых их крупных кластеров генов в геном клетки-хозяина. Существующие на текущий момент технологии, решающие задачи интеграции, малоэффективны, неудобны в использовании, трудо- и времязатратны. Более того, их применимость в большинстве случаев ограничена узким кругом модельных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli*, что ограничивает

возможности работы с родственными объектами, представляющими интерес с точки зрения их биотехнологического применения или клинической практики.

Цель работы: создание инструментов для интеграции немаркированных конструкций в геном *Escherichia coli* и других представителей порядка *Enterobacteriales* на основе системы Red рекомбинации бактериофага λ .

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Разработка стратегии негативной селекции, функционирующей независимо от генотипа штамма и обладающей предельно возможной эффективностью;
2. Создание на основе новой стратегии негативной селекции и Red рекомбинации технологии интеграции в геном *Escherichia coli* протяженных конструкций, не содержащих селективных маркеров;
3. Адаптация технологии интеграции для использования в работе с немодельными представителями порядка *Enterobacteriales*.

Научная новизна работы

В ходе настоящей работы на основе ориджина рМВ1 был сконструирован репликон, активность которого подавляется в присутствии изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида, что позволяет стабильно поддерживать его или удалять из клеток, изменяя состав питательной среды. Было показано, что оптимизация процедуры λ Red-зависимой интегративной трансформации позволяет достичь частоты рекомбинации, достаточной для конструирования коротких делеций и инсерций в хромосоме *Escherichia coli* без использования прямой или негативной селекции. Для интеграции протяжённых немаркированных фрагментов ДНК была разработана стратегия негативной селекции с использованием системы, состоящей из промоторов P_L и P_R бактериофага λ , репрессора CI , гена устойчивости к хлорамфениколу *cat* и токсина Нок. Показано, что эффективность маркера *cl-hok*, выраженная как величина, обратная скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать в селективных условиях, достигает предельно возможных значений. Было показано, что основным фактором, ограничивающим эффективность интеграции протяжённых

конструкций, синтезированных с помощью ПЦР, является эндонуклеаза EcoKI, разрушающая неметилованную ДНК в цитоплазме клеток, несущих дикий аллель *hsdR*. Впервые было продемонстрировано, что это ограничение может быть снято в результате коэкспрессии генов Red и антирестрикционной функции Ocr бактериофага T7, что позволило интегрировать немаркированные фрагменты ДНК длиной 6-8 т.п.н. в произвольные локусы хромосомы путём отбора рекомбинантов, потерявших маркер *cI-hok*. Было показано, что негативная селекция *cI-hok* и Red-рекомбинация при посредстве Ocr полностью функциональны не только в *Escherichia coli*, но и в других представителях порядка *Enterobacteriales*, а именно *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* и *Pantoea anantiss*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Созданная в ходе настоящей работы технология интеграции в бактериальную хромосому при помощи негативной селекции *cI-hok* и Ocr-опосредованной Red рекомбинации может быть использована в широком круге задач, подразумевающих внесение в геном протяженных фрагментов ДНК, кодирующих гетерологичные метаболические пути и другие функции, контролирующие жизнедеятельность и фенотип клетки. К таким задачам можно отнести создание штаммов-продуцентов органических соединений; клонирование крупных кластеров генов в геном модельного объекта и их функциональный анализ в гетерологичном генетическом окружении; создание штаммов, обладающих исходно несвойственными им метаболическими возможностями, например, способностью расти на новых субстратах или разрушать ксенобиотики. Высокая эффективность негативной селекции *cI-hok* позволяет использовать этот маркер для исследования стабильности поддержания эписом в клетке или изучения нестабильности и эволюции генома в результате спонтанных структурных перестроек. Независимость созданной технологии от специфических клеточных функций, в частности систем метилирования и рестрикции, и функциональность в ряде энтеробактерий потенциально позволяет адаптировать её для исследования биологии клинически релевантных микроорганизмов,

принадлежащих к порядку *Enterobacteriales*, таким как *Klebsiella*, *Shigella* или *Yersinia*.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования служили *Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* LT2, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Pantoea ananatis* SC17(0), тогда как предметом исследования была разработка инструментов интеграции в геном данных микроорганизмов.

Методология диссертационного исследования

В работе были использованы стандартные методы работы с культурами микроорганизмов и бактериофагов, а также методы молекулярного клонирования.

Личный вклад автора заключается в выборе направлений исследования, дизайне, планировании и выполнении экспериментов, анализе и интерпретации результатов, написании статей и представлении результатов работы на конференциях.

Степень достоверности полученных данных подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методик, актуальных методов анализа и статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Негативная селекция на основе двухпромоторной системы P_L/P_R , её репрессора *CI*, гена устойчивости к хлорамфениколу и токсина *Hok* чрезвычайно устойчива к возникновению спонтанных мутантов, выживающих в селективных условиях. Высокая эффективность селекции достигается благодаря подавлению роста спонтанных *cl* мутантов в результате дерепрессии *Hok*.
2. Фрагментация ДНК в цитоплазме эндонуклеазой *EcoKI* в значительной степени препятствует интеграции протяжённых неметилированных конструкции в хромосому *Escherichia coli*. Подавление активности *EcoKI* в результате коэкспрессии антирестрикционной функции *Osc* фага T7 и генов *Red* увеличивает частоту рекомбинации более, чем на три порядка.
3. Негативная селекция *cl-hok* в сочетании с *Osc*-опосредованной *Red*-рекомбинацией позволяет интегрировать немаркированные фрагменты ДНК,

синтезированные с помощью ПЦР и содержащие целые опероны, в произвольные локусы хромосомы, а также переносить немаркированные локусы между штаммами с помощью P1-трансдукции.

4. Технология интеграции с помощью негативной селекции *cI-hok* и Оcr-опосредованной Red-рекомбинации универсальна и позволяет работать не только с *Escherichia coli*, но и с другими представителями порядка *Enterobacteriales*.

Апробация работы

Результаты диссертационного исследования были представлены на XX Зимней молодёжной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Рощино, 2018) и Школе-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике» (Москва – Пущино, 2018).

Публикации

Результаты работы изложены в 3 статьях в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Структура работы

Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы», «Приложения». Работа изложена на 153 страницах, содержит 5 таблиц, 29 рисунков и приложение. Список литературы включает 185 источников.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Нетрусову А. И. за помощь в подготовке диссертации. Автор признателен другу и наставнику к.б.н. Юзбашеву Т. В. за переданный опыт. Автор благодарен д.б.н. Синеокому С. П. и Выборной Т. В. за помощь в материальном обеспечении исследования, а также Степановой А. А., Кудине М. Д., Ханфёрову А. Ю. и Хозову А. А. за помощь в выполнении работы. Автор признателен д.б.н. Завигельскому

Г. Б., к.б.н. Крылову А. и Мартьянову С. В. за предоставление штаммов и генетических конструкций. Автор выражает глубокую благодарность Звонарёвой Е. С. за участие и поддержку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Открытие Red-зависимой гомологичной рекомбинации бактериофага λ

Вслед за обнаружением у *E. coli* гена *recA* (Clark et al., 1965), играющего центральную роль в процессе гомологичной рекомбинации и репарации двунитевых разрывов в клетке, было обнаружено бактериофаг λ способен эффективно рекомбинировать в *recA* штаммах. Это означало, что бактериофаг имеет собственную систему гомологичной рекомбинации (Takano, 1966; Brooks et al., 1967). Для ее идентификации было необходимо получить мутантов λ , дефектных по способности к рекомбинации. Впервые такой мутант был получен на бактериофаге, представляющем собой гибрид между λ и лямбдоидом $\phi 80$. Было показано, что этот гибрид обладал в ~ 100 раз сниженной способностью к рекомбинации и содержал делецию, которая картировалась в центральной области хромосомы (Franklin, 1967). Затем были получены точечные мутанты λ также дефектные по рекомбинации при инфекции *recA* штамма. Эти мутации картировались вблизи гена *cIII* (Echols et al., 1968; Signer et al., 1968). Мутации были названы *red* (от recombination defective) для того, чтобы отличать их от мутаций в *rec* генах *E. coli*.

Позже был обнаружен ген бактериофага, необходимый для роста *red* мутантов на *recA* штаммах *E. coli* (Zissler et al., 1971). Продукт этого гена, названного *gam*, был каким-то образом связан с репликацией хромосомы бактериофага. Мутанты по *gam* были неспособны переходить к поздней стадии репликации по механизму катящегося кольца (Enquist et al., 1973), которая приводит к образованию конкатамерной ДНК, упаковывающейся в фаговую головку. Мутанты λ *gam* были способны реплицироваться нормально с образованием конкатамера в штаммах *E. coli* с мутацией в гене *recB* (Zissler et al., 1971; Enquist et al., 1973), кодирующем субъединицу комплекса RecBCD (также известного как экзонуклеаза V, ExoV). На основании этого предполагали, что продукт гена *gam* представляет собой ингибитор активности комплекса RecBCD,

который сам по себе подавляет позднюю репликацию λ путем экзонуклеазной деградации линейного конкатамерного генома фага. Эта гипотеза была подтверждена в экспериментах *in vitro*. Gam ингибировал как АТФазную, так и экзонуклеазную активность комплекса RecBCD (Karu et al., 1975). Эти ранние исследования привели к формированию устоявшейся сейчас модели, в соответствии с которой олигомеры генома λ , упаковывающиеся в головку одновременно с нарезанием терминазой на мономеры в области *cot* сайтов, образуются либо в результате Red-зависимой рекомбинации мономерных копий генома, либо в результате Gam-зависимой репликации по механизму катящегося кольца. В отсутствие и *red*, и *gam* генов λ образует очень мелкие бляшки на штаммах дикого типа, и не растет совсем на дефектных по *recA*.

1.2 Сравнение Red- и RecABCD-путей гомологичной рекомбинации

В исследованиях, в которых сравнивали системы гомологичной рекомбинации λ Red и клеточную RecABCD, было показано, что у мутантов λ *red* урожай в ходе инфекции и частота рекомбинации были снижены в ~ 10 раз (Echols et al., 1968). Это указывало на то, что RecABCD система неспособна катализировать рекомбинацию генома λ также эффективно, как система λ Red. Причина этого явления, как станет ясно позже, заключается в отсутствии в геноме λ χ -сайтов, необходимых для корректной работы комплекса RecBCD. С другой стороны, на фоне мутации *recA*, инактивирующей систему гомологичной рекомбинации клетки, система λ Red обеспечивала сниженную относительно дикого штамма эффективность рекомбинации, что выражалось в низкой частоте конъюгации и неспецифической трансдукции (Wackernagel et al., 1974; Weisberg et al., 1974). В дальнейшем было показано, что система λ Red не способна осуществлять рекомбинацию фага λ в *recA* штаммах в условиях, когда репликация хромосомы λ подавлена (Stahl et al., 1978). В целом, неспособность RecABCD и Red систем полностью заместить друг друга отражает различия в характерных для них субстратах. RecABCD выполняет функцию репарации двунитевых разрывов и встраивания в хромосому протяженных молекул ДНК (длиной в несколько

сотен тысяч пар нуклеотидов), полученных клеткой в ходе конъюгации или трансдукции, тогда как Red контролирует рекомбинацию реплицирующихся хромосом λ .

Исторически, изучение рекомбинации мутантов λ *red gam* помогло идентифицировать ключевые детали RecABCD-зависимого пути (Lam et al., 1974; Stahl et al., 1975). Основная черта этого пути рекомбинации заключается в роли небольших ассиметричных последовательностей – упомянутых выше χ -сайтов (5'-GCTGGTGG-3'). RecBCD связывает конец двунитевой ДНК (днДНК) продвигается по молекуле, расщепляя обе цепи (Taylor et al., 1980; Dixon et al., 1993). После того как комплекс встречает χ -сайт (с правой стороны), его активность изменяется таким образом, что расщепление ДНК в 3'-5' направлении значительно снижается, в то время как в 5'-3' – слегка повышается (Dixon, 1993). Дальнейшее продвижение комплекса приводит к образованию свободного однострессового 3'-конца, доступного для связывания RecA (Anderson et al., 1999; Arnold et al., 2000). Поскольку λ не имеет на своей хромосоме χ -сайтов, он не может эффективно рекомбинировать при посредстве RecBCD. Их отсутствие приводит к падению уровня рекомбинации λ *red gam* в ~10 раз. Точечные замены в хромосоме этих мутантов, в результате которых образовывался полноценный χ -сайт, приводили к восстановлению способности к рекомбинации и росту на *E. coli* (Lam et al., 1974). Это свойство использовалось для того, чтобы исследовать роль χ -сайтов как горячих точек RecABCD-зависимой рекомбинации (Stahl, 1998). Впоследствии, было показано, что добавленные к линейным интегративным кассетам в соответствующем положении χ -сайты способствовали их интеграции в геном клетки в результате RecABCD-рекомбинации (Dabert et al., 1997), тогда как в отсутствие χ -сайтов линейные молекулы ДНК нестабильны в цитоплазме клетки по причине нуклеазной активности комплекса RecBCD и не могут эффективно рекомбинировать с хромосомой.

1.3 Белки в составе системы λ Red

1.3.1 Экзонуклеаза λ Exo

Еще до того, как были получены и охарактеризованы мутанты λ *red*, была идентифицирована экзонуклеаза, присутствующая в лизате клеток в ходе протекания литического цикла развития фага λ (Radding, 1964). Изучение очищенного фермента показало, что экзонуклеаза расщепляет одну из цепей днДНК в направлении 5'-3'. При этом активность по отношению к фосфорилированному 5'-концу намного выше по сравнению с нефосфорилированным (Little et al., 1967). Гипотеза об участии Exo в протекании процесса Red-зависимой рекомбинации основывалась на том, что инфекция клеток *E. coli* многими из λ *red* мутантов не индуцировала синтез экзонуклеазы (Manly et al., 1969). Помимо этого, некоторые из мутантов λ , у которых способность Red-зависимой рекомбинации была температурочувствительной, продуцировали температурочувствительную экзонуклеазу (Shulman et al., 1970). Эти исследования показали, что Exo играет ключевую роль в Red-рекомбинации, которая, возможно, заключалась в образовании свободного 3'-конца, который затем подвергается инвазии в гомологичной области днДНК, что ведет к образованию гетеродуплекса, обмену цепями и последующим стадиям процесса рекомбинации.

Длина полипептидной цепи Exo составляет 226 аминокислотных остатков, белок имеет массу 25,9 кДа. Фермент для своей работы требует наличия в среде ионов Mg^{2+} и имеет оптимум pH 9,5 (Little et al., 1967). Скорость расщепления онДНК приблизительно в 100 раз меньше таковой для днДНК с тупыми концами. Молекулы днДНК, содержащие 3'-выступающий конец длиной более 100 нуклеотидов – плохой субстрат для Exo (Sriprakash et al., 1975). Фермент неспособен начать расщепление с одностороннего разрыва, хотя и может связываться с ним (Cassuto et al., 1971). Exo продвигается по молекуле ДНК и расщепляет одну из цепей в направлении 5'-3' со скоростью приблизительно 12 нуклеотидов в секунду (Subramanian, 2003).

В растворе экзонуклеаза существует в форме тримера. Тример имеет торроидальную структуру с центральным каналом в форме воронки. С одной стороны отверстие имеет диаметр 15Å, с другой – 30Å (Kovall, 1997). Предполагают, что конец молекулы ДНК попадает внутрь тримера со стороны более широкого отверстия, внутри один из активных сайтов выщепляет одну цепь в направлении 5'-3', а вторая цепь выходит через более узкое отверстие. Таким образом, фермент окружает оставшуюся цепь и перемещается по ней по типу скользящего зажима, что объясняет высокую процессивность Eho, составляющую не менее 3000 нуклеотидов за одно событие посадки на конец молекулы ДНК (Carter et al., 1971).

1.3.2 λ Beta

В первых экспериментах по очистке Eho было обнаружено, что с экзонуклеазой связан другой неизвестный белок массой 29,7 кДа (полипептид состоит из 261 аминокислоты), названный затем Beta, функция которого была на тот момент неизвестна (Radding, 1966). Было показано, что Beta образует комплекс с Eho в стехиометрическом соотношении 1:1, хотя и не было известно, имеет ли это какое-либо значение в клетке. Beta, связанный с Eho, никак не влиял на каталитические параметры последнего (Carter et al., 1971). Позже показали роль Beta в уменьшении длины участка ДНК, который выщепляет Eho без высвобождения субстрата. Возможно, это происходит благодаря тому, что Beta предотвращает связывание Eho с частично расщепленными молекулами ДНК (Mitsis et al., 1999).

Впервые функция Beta была показана в работе, в которой исследовали взаимодействие этого белка с ДНК. Оказалось, что Beta катализирует ренатурацию комплементарной онДНК (Kmiec et al., 1981). Кроме того, этот белок способен стимулировать *recA*-зависимое образование гетеродуплекса между одно- и двунитевой ДНК (Muniyappa et al., 1986). Комплекс Beta с одонитевым олигонуклеотидом прочно связывается с комплементарным олигонуклеотидом и не связывается с некомплементарным. Beta остается связанным с двунитевым

продуктом, но при этом не способен связываться с предварительно отождествленными друг на друга олигонуклеотидами. Предполагают, что Beta катализирует отжиг комплементарных однонитевых молекул ДНК благодаря тому, что он прочнее связывается с двунитевым продуктом, чем с однонитевым субстратом реакции.

Исследователи включают Beta в категорию белков, выполняющих функцию отжига комплементарных участков онДНК (ssDNA annealing proteins, SSAPs). Эти белки присутствуют как в клетках прокариот, так и эукариот, и характеризуются структурным и функциональным сходством. Они участвуют в RecA-зависимых и RecA-независимых путях рекомбинации, образуют олигомеры в виде колец и филаментов *in vitro*, связывают и, в отличие от RecA, отжигают комплементарные молекулы онДНК без гидролиза АТФ. Анализ последовательности данных белков позволяет разделить их на три группы, типовыми представителями которых являются λ Beta, Erf бактериофага P22 и Rad52-подобные белки (Iyer et al., 2002). Несмотря на функциональное подобие и сходство в четвертичной структуре, между представителями перечисленных групп отсутствует гомология последовательности. Это свидетельствует о том, что три группы возникли независимо у представителей разных таксонов.

Наиболее характерное свойство SSAP-белков – образование олигомеров, имеющих кольцевую структуру, которые различимы в электронный микроскоп. В одной из работ было показано, что Beta в отсутствие ДНК образует кольца диаметром 145Å из 12 субъединиц, которые окружают центральное отверстие диаметром 35Å. При добавлении онДНК олигомер также представляет собой кольцо, но большего диаметра (185Å), и состоит из 15-16 субъединиц. Добавление комплементарной молекулы онДНК приводит к образованию ДНК-белкового филамента в форме левозакрученной спирали диаметром ~200Å. Линейная онДНК с тупыми концами является плохим субстратом для образования филамента (Passy et al., 1999). Авторы предполагают, что большое кольцо связывает онДНК и инициирует процесс отжига комплементарных молекул с образованием спирального филамента. Считается также, что онДНК обернута вокруг кольца так, как это ранее предполагалось для белка Erf (Poteete et al., 1983).

Позднее более тщательный анализ с помощью атомно-силового микроскопа показал, что в отсутствие ДНК олигомер Beta имеет структуру кольца с зазором, которое можно представить, как участок правозакрученной спирали. В целом форма олигомера напоминает гровер-шайбу. Добавление онДНК приводило к разрушению этой структуры, а при добавлении второй комплементарной молекулы образуется левозакрученная спираль с 14 мономерами на виток. На каждый мономер приходится 11 пар оснований, а целый виток связывает 155 оснований. Минимальная длина комплементарных молекул ДНК, необходимая для отжига и образования стабильного комплекса Beta-днДНК составляла от 16 до 20 нуклеотидов. Данная величина была получена путем измерения электрофоретической мобильности в геле смеси Beta и онДНК. Релевантность этого значения функции Beta в процессе рекомбинации была подтверждена *in vivo* (Erler et al., 2009).

С точки зрения функции Beta в процессе рекомбинации бактериофага λ особенно интересно его сравнение с RecA. RecA занимает центральное место в нескольких путях гомологичной рекомбинации и рекомбинационной репарации генома клетки. Этот белок имеет несколько активностей. Во-первых, он связывается со свободным 3'-концом и образует нуклеофиламент. Ключевая особенность RecA-филамента заключается в способности к поиску гомологии и инвазии в гомологичный дуплекс с образованием D-петли. После этого, RecA обеспечивает обмен цепями между гомологичными молекулами, вытесняя исходную цепь и заменяя ее на ту цепь, которая образовывала филамент. Помимо этого, для RecA-филамента показаны связывание и гидролиз АТФ (Bell et al., 2016).

Beta также, как и RecA, способен катализировать обмен цепями. Было показано, что олигонуклеотид длиной 63 основания при добавлении Beta вытесняет олигонуклеотид (43 основания), отождествленный на онДНК бактериофага M13. Эта процесс идет даже, если более длинная молекула содержит одиночные замены, которые предотвращают спонтанную реакцию (Li et al., 1998).

Более важный вопрос заключается в том, может ли нуклеофиламент, образованный Beta и свободным 3'-концом, вторгаться в гомологичный дуплекс и образовывать D-петлю так же, как это делает RecA-филамент (Roca et al., 1997). Было показано, что Beta способен это делать, но, в отличие от RecA-нуклеофиламента, инвазия Beta-нуклеофиламента на гомологичном участке днДНК может происходить лишь при условии, что его ГЦ-состав не превышает 37% (Rybalchenko et al., 2004). Вероятно, причина заключается в том, что на участках с низким значением ГЦ-состава этот процесс идет благодаря более легкому плавлению цепей днДНК. Учитывая, что ГЦ-состав хромосомы *E. coli* и фага λ составляет 52% и 50% соответственно, очевидно, что это процесс не является биологически релевантным и не идет *in vivo*.

Несмотря на то, что RecA и Beta сходны функционально и катализируют отжиг комплементарных участков онДНК, они не имеют гомологичных участков в своей последовательности (Murphy, 2016) и, по-видимому, эволюционировали независимо. Присущие им сходства могут объясняться тем, что они имеют одни и те же субстраты, онДНК и днДНК.

1.3.3 λ Gam

В отсутствие χ -сайтов комплекс RecBCD проявляет сильную экзонуклеазную активность и деградирует любую линейную ДНК, попавшую в клетку. По этой причине бактериофаги, имеющие линейную двунитевую хромосому, вынуждены кодировать определенные функции для защиты от RecBCD. Например, фаг T4 несет ген 2, продукт которого связывается с концами днДНК и предотвращает связывание RecBCD (Oliver et al., 1977). Фаг λ содержит ген, который комплементирует рост мутанта T4 2 (Marsić et al., 1993). Названный *gam*, он кодирует небольшой белок массой 11,6 кДа и состоящий из 98 аминокислотных остатков. Известно, что он ингибирует все активности RecBCD путем связывания комплекса и предотвращения его взаимодействия с концами днДНК (Court et al., 2007; Murphy, 2007). Фенотип клетки, в которой экспрессируется *gam*, эквивалентен фенотипу мутанта *recBC* в отношении

чувствительности к УФ-излучению и рекомбинации χ -содержащего мутанта λ *red*. В исследованиях, основанных на измерении эффективности конъюгационной рекомбинации, фенотип клеток, экспрессирующих *gam*, не полностью совпадал с таковым у *recBC* мутанта, что объясняется различным влиянием остаточной активности RecBCD на рекомбинацию фаговой хромосомы и хромосомы клетки в ходе конъюгации (Murphy, 1991).

Оверэкспрессия *gam* в контексте хромосомы бактериофага λ под контролем P_L промотора приводит к потере жизнеспособности (Sergueev et al., 2001). Это не является прямым следствием ингибирования RecBCD, поскольку мутанты Δ *recBCD* сохраняют способность к росту. Поэтому предполагают, что Gam может выполнять еще неизвестные функции (Caraldo-Kimball et al., 1971). Интересно, что экспрессия *gam* может быть полезна клетке в условиях облучения рентгеновским излучением (Trogovsević et al., 1975). Считается, что устойчивость к излучению развивается в результате ингибирования деградации хромосомной ДНК комплексом RecBCD в области множественных двунитевых разрывов, что дает клетке время и возможность репарировать хромосому.

1.4 Предполагаемые механизмы Red-зависимой гомологичной рекомбинации

Первая работа по исследованию рекомбинации генома бактериофага λ была проведена в 1961 году Мезельсоном и Вейглом. Цель исследования заключалась в том, чтобы выяснить, какой из предполагаемых механизмов рекомбинации вовлечен в образование в ходе инфекции рекомбинантных фагов. На тот момент предполагалось, что таких механизмов может быть два. Считалось, что хромосома λ может иногда рваться по неопределенным причинам, а затем объединяться с другой хромосомой, порванной похожим образом (механизм «break-join»). Второй механизм предполагал, что во время репликации генома λ в качестве матрицы сначала может использоваться одна хромосома, а затем другая («soru-choise»). В зависимости от того, какой механизм имеет место во время инфекции, должен был различаться состав хромосомы рекомбинантных фаговых частиц. В

первом случае рекомбинантные хромосомы должны были содержать участки генома фага, заразившего клетку, а во втором она должна была быть полностью синтезирована заново. Мезельсон и Вейгл скрещивали в клетках *E. coli* два типа фагов: один был мечен тяжелыми изотопами C^{13} и N^{15} , а другой – нет. После завершения инфекционного цикла они разделяли клеточный лизат, содержащий фаговое потомство, путем центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия. Авторы обнаружили, что геном рекомбинантов содержал участки тяжелой меченой ДНК, полученных от исходных фаговых частиц (Meselson et al., 1961). Этот результат указывал, что рекомбинация проходит по механизму «break-join».

Эти эксперименты были выполнены еще в то время, когда не было известно, что во время инфекции λ могут быть активны сразу три системы рекомбинации: *rec* система клетки, *red* и *int* системы бактериофага. В последующие годы, когда все три системы уже были известны, была проведена похожая работа, но в условиях активности только одной системы рекомбинации из трех (Kellenberger-Gujer et al., 1971). Результаты свидетельствовали, что все три системы могут действовать по механизму «break-join». Приблизительно в это же время стало ясно, что для того, чтобы более детально проследить путь исходной ДНК в геноме рекомбинантного потомства, необходимо предотвратить репликацию фагового генома. В результате репликации образуется большое количество нерекомбинантов и потомков рекомбинантов, среди которых трудно различить нереплицированные рекомбинантные фаговые частицы, образование которых свидетельствует о «break-join» механизме.

Впоследствии были получены мутантные штаммы *E. coli*, обладающие температурочувствительной репликацией (Stahl et al., 1972a) и мутанты фага, содержащие мутацию в гене *P*, который контролирует репликацию генома λ (Stahl et al., 1972b). Скрещивания фагов с использованием этих штаммов можно было проводить в условиях полного отсутствия репликации. В результате этих экспериментов стало известно, что 1) в отсутствие репликации фагового генома в *recA* мутантах значительно снижается число рекомбинантов, образованных при участии системы λ Red (Stahl et al., 1971); 2) рекомбинация необходима для

развития нереплицирующегося фага, попавшего в клетку (Stahl et al., 1972b); 3) в условиях строгого блока по репликации рекомбинация происходит только на участке в правой части генетической карты λ вблизи *cos*-сайта (Stahl et al., 1985), точки, в которую терминаза вносит двунитевой разрыв. Разрыв же необходим для образования свободных концов и инициации рекомбинации. Это подтверждается тем, что рекомбинация нереплицирующегося генома фага стимулируется искусственно внесенным разрывом (Thaler et al., 1987).

Основным результатом перечисленных работ является осознание роли репликации фагового генома в процессе Red-зависимой рекомбинации. Считалось, что в результате репликации по механизму катящегося кольца образуется свободный двунитевой конец, инициирующий обмен цепями и последующую рекомбинацию при посредстве Red-системы. На основании этого представления были сформулированы две модели механизма λ Red рекомбинации, ключевой особенностью которых в первом случае является *RecA*-зависимая инвазия цепи, а во втором - *RecA*-независимый отжиг однонитевых участков. Данные механизмы были сформулированы на основе генетических исследований по скрещиванию λ , приведенных выше, так и биохимического исследования структуры и свойств λ Echo и λ Beta.

1.4.2 RecA-независимый путь Red рекомбинации

Наиболее вероятным механизмом протекания Red-зависимой рекомбинации во время инфекции λ считается процесс объединения линейных молекул, каждая из которых имеет свободный однонитевой 3'-конец. В этом случае рекомбинация начинается с двунитевого разрыва в различных областях хромосомы фага-донора и реципиента (Stahl et al., 1997). λ Echo деградирует одну из цепей в направлении 5'-3'. Beta катализирует отжиг свободных гомологичных 3'-концов. Затем бреши достраиваются и лигируются клеточными ферментами (рис. 1Б). Участие *RecA* не требуется по причине того, что этот механизм не включает в себя инвазию однонитевого конца в гомологичный дуплекс.

Может ли этот механизм отражать то, что происходит во время нормальной инфекции клеток бактериофагом λ ? Одной из стадий его цикла развития является репликация генома по механизму катящегося кольца. Предполагают, что в ходе этого процесса свободные концы могут появляться на всем протяжении генома фага (Wilkins et al., 1974). При этом перекрывающиеся гомологичные участки хромосом, необходимые для рекомбинации по механизму отжига, могут образовываться при репликации двух геномов в противоположных направлениях.

Помимо того, что этот механизм соответствует наблюдениям, сделанные при скрещивании фагов в условиях блока по репликации и объясняет необходимость репликации для рекомбинации, возможность протекания рекомбинации по этому механизму была показана экспериментально (Wackernagel et al., 1973). Авторы трансформировали клетки *recB* мутанта *E. coli* фрагментами хромосомы λ (длиной $\sim 50\%$ относительно целого генома), полученными путем разрывов в случайных местах. Мутация *recB* была необходима для того, чтобы исключить гидролиз попавших в клетку фрагментов комплексом RecBCD. В результате трансфекции фрагментированным геномом λ в клетках развивался нормальный фаг и образовывались стерильные бляшки с частотой приблизительно в 150 раз меньшей, чем в контрольном эксперименте (трансфекция интактной ДНК). Количество бляшек падало в 400 раз, если в эксперименте использовался *exo* мутант, что свидетельствовало об участии Exo в восстановлении полноценного генома. Мутация по гену *bet* снижала эффективность образования бляшек только в 10 раз. Кажущееся несоответствие может быть связано с присутствием в клетке RecA, который может функционально заменять Beta в процессе отжига одностранных участков.

Red-зависимая рекомбинация по механизму отжига гомологичных одностранных участков хромосомы была также продемонстрирована *in vivo* в работе Сталя и её коллег (Stahl et al., 1997). В этом эксперименте авторы проводили скрещивание фагов в отсутствие репликации и показали, что Red-зависимая рекомбинация в *recA* штамме происходит наиболее эффективно, если в оба рекомбинирующих генома внесен двунитевой разрыв в точках, которые

сдвинуты друг относительно друга для образования перекрывающихся концов. Поскольку в норме концы появляются при репликации генома фага, в условиях блока по репликации искусственное внесение разрывов в хромосому существенно стимулировало прохождение рекомбинации.

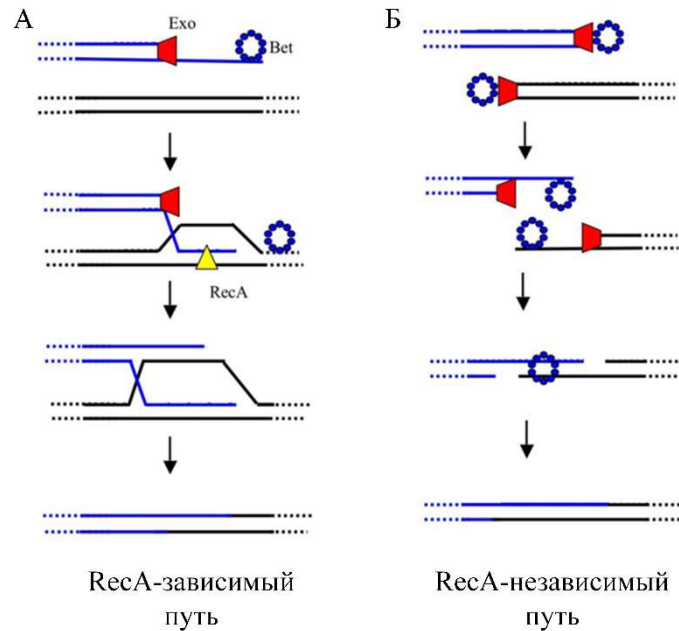


Рисунок 1. Механизмы RecA-зависимой (А) и RecA-независимой (Б) λ Red-рекомбинации (Murphy, 2016).

1.4.1 RecA-зависимый путь Red рекомбинации

Зависимость рекомбинации λ от RecA в условиях блока по репликации объясняют тем, что в этом случае рекомбинация инициируется в области разрыва по *cos*-сайту. Поскольку две молекулы, имеющие разрыв в одном и том же месте, не способны рекомбинировать между собой, рекомбинация может произойти между линейным и кольцевым геномом в гомологичной области. Здесь функция Exo и Beta заключаются в удалении одной из цепей в направлении 5'-3' с образованием свободного 3'-конца. Затем RecA должен вытеснить Beta с однонитевого участка, найти гомологию и осуществить инвазию в гомологичный дуплекс (рис. 1А). После этого рекомбинация протекает по хорошо известному для *E. coli* пути, который включает в себя миграцию хиазмы и разрешение структуры Холлидея при участии резольвазы RuvABC (Kowalczykowski et al., 1994).

Возникает вопрос, насколько эта модель отражает те процессы, которые в норме протекают в клетке при инфекции λ . Во-первых, фаг растет и рекомбинирует нормально на *recA* штаммах. Как было описано выше, необходимость в RecA появляется только при условии, что репликация генома заблокирована. Учитывая то, что Φ_{xo} в клетке, по-видимому, физически связан с Beta (Radding, 1966) и, таким образом, участвует в посадке Beta с образованием нуклеофиламента, участие RecA в Red-зависимой рекомбинации возможно, но маловероятно в ходе нормальной инфекции. Предполагают, RecA может принимать участие в случае, если Beta-нуклеофиламент не может найти однонитевой гомологичный участок. В этом случае Beta каким-либо образом должен быть удален с 3'-конца и заменен на RecA, который способен осуществлять поиск гомологии и инвазию на двунитевом участке (Poteete, 2004).

1.5 λ Red – инструмент редактирования генома *Escherichia coli*

1.5.1 Методы, предшествующие λ Red

Методы, позволяющие инактивировать целевой ген, составляют основу инструментария генетического анализа как бактерий и дрожжей, так и высших эукариот. В ранних работах на бактериях для этих целей клетки трансформировали нереплицирующимися плазмидами, несущими участок гомологии к выбранному локусу, селективный маркер (чаще всего ген устойчивости к антибиотику) и маркер для негативной селекции. В качестве вектора использовали плазмиды на основе ориджина репликации ColE1, нефункционального в *polA* мутантах (Guttererson et al., 1983), или температурочувствительный вариант репликона pSC101 (Hamilton et al., 1989). Поскольку эти конструкции не могут реплицироваться в клетках, отобранные по селективному маркеру трансформанты являются результатом коинтеграции плазмиды и хромосомы в рамках гомологичной области. В зависимости от конфигурации участка гомологии может приводить к разрушению рамки целевого гена или его дупликации. При этом вторая привнесенная копия может быть

модифицирована. Затем полученных трансформантов подвергали процедуре негативной селекции для выщепления векторной части конструкции. В результате этого либо восстанавливается интактная последовательность гена, либо исходный ген заменяется модифицированной копией. Поэтому выжившие в ходе негативной селекции клоны затем подвергают скринингу с целью отобрать нужного мутанта.

Несмотря на то, что подобная технология успешно применялась на протяжении многих лет, это очень трудоемкая и длительная процедура, которая осложняется еще тем, что интеграции конструкции в хромосому и разрешение конинтегрантной структуры происходит с достаточно низкой частотой. Кроме того, конструирование плазмид для интеграции также требует достаточно много времени.

Альтернативой этой технологии была трансформация клеток линейной интегративной кассетой, которая состояла из селективного маркера в центре и фланкирующих последовательностей, гомологичных целевому локусу на хромосоме. Двойной кроссинговер между такой кассетой и хромосомой приводит к тому, что последовательность между участками гомологии заменяется на селективный маркер (Russell et al., 1989). При этом целевая мутация (например, делеция) может быть получена в результате одноэтапной процедуры без необходимости выщеплять какой-либо участок хромосомы, как в случае со встраиванием целой плазмиды. Однако, при необходимости использовать селективный маркер повторно кассета также должна была содержать второй маркер для негативной селекции.

По причине того, что линейная ДНК нестабильна в клетках *E. coli* в результате расщепления комплексом RecBCD (ExoV) описанный метод требует применения специальных штаммов, в которых RecBCD-зависимый путь рекомбинации инактивирован мутацией и активирован один из альтернативных путей. К ним относятся *ΔrecBC sbcA* и *ΔrecBC sbcB15* штаммы. Аббревиатура *sbc* происходит от словосочетания «supressors of *recBC*». Это означает, что в *sbc*-мутации супрессируют неспособность штамма к гомологичной рекомбинации по RecBCD пути. В *sbcA* мутантах активируется транскрипция генов *recE* и *recT* в

составе *RecE* профага, дефектного лямбдоидного элемента в составе хромосомы *E. coli*. *RecE* и *RecT* являются функциональными гомологами λ *Eco* и λ *Beta* и способны осуществлять встраивание линейных кассет в хромосому (Clark et al., 1993). Под мутацией *sbcB15* подразумевают точечную мутацию в гене, который сейчас называется *xonA*. Его продукт – экзонуклеаза I, расщепляющая однонитевую ДНК в направлении 3'-5' (Kushner et al., 1972). Мутация снижает экзонуклеазную активность фермента, но при этом сохраняется его способность связываться с 3'-концом и защищать его от действия других экзонуклеаз (Thoms et al., 2007). Мутация *sbcB15* активирует *RecF*-зависимый путь рекомбинации, в норме активный на протяженных участках вне концов ДНК, и позволяет ему катализировать встраивание в хромосому линейных фрагментов, ограниченных двунитевыми концами (Horii et al., 1973). Это свойство позволяет трансформировать мутантные клетки линейными кассетами для получения делеций и других мутаций.

1.5.2 λ Red-рекомбинирование

Применение *recBC* мутантов способствовало развитию подхода к конструированию штаммов *E. coli* путем трансформации клеток линейными интегративными кассетами, содержащими маркер устойчивости к антибиотикам, фланкированный участками гомологии к целевому локусу. В этом случае образование и разрешение коинтегранта не требуется для образования желаемой структуры рекомбинантного участка хромосомы. С другой стороны, существенное ограничение метода заключается в возможности работать только с небольшим числом специальных штаммов. После того, как маркированная мутация получена, ее требовалось перенести в целевой штамм путем неспецифической трансдукции фагом P1. Затраты времени на получение одной мутации дополнительно увеличивались по причине того, что получение готовой интегративной кассеты требовало нескольких этапов клонирования маркера и участков гомологии в составе плазмидных векторов.

В 1998 году была опубликована работа, в которой автор показал, что экспрессия генов λ Red (здесь и далее под λ Red имеются ввиду гены *gam*, *bet* и *exo*), находящихся в клетке на автономно реплицирующейся плазмиде, дает возможность встраивать линейные фрагменты в хромосому (Murphy, 1998). Объясняется это тем, что Gam ингибирует экзонуклеазную активность RecBCD, а Exo и Beta представляют собой альтернативную эффективную систему рекомбинации. Основное преимущество такого подхода – возможность работать с любым штаммом вне зависимости от его генотипа, потому что все гены, необходимые для ингибирования RecBCD в *trans*-положении и осуществления рекомбинации, находятся на плазмиде. Кроме того, продемонстрированная эффективность рекомбинации превышала таковую для *recBC sbcB15* штаммов на 1-2 порядка. В качестве интегративной кассеты автор использовал фрагменты ДНК с участками гомологии длиной ~1000 п.н., так как считалось, что такая протяженная гомология оптимальна для рекомбинации в *recBC* штаммах. Также было показано, что кассета может быть получена путем объединения фрагментов ДНК методом OE-PCR (overlap extension polymerase chain reaction), что значительно снижает затраты времени и труда по сравнению с многостадийным клонированием.

Следующая работа оказала колоссальное влияние на технологию генетической инженерии на *E. coli*. Дональд Курт и его коллеги изучали возможность использования дефектного профага λ в составе хромосомы для индуцируемой экспрессии генов λ Red (Yu et al., 2000). С использованием этой системы авторы показали, что хромосомальный профаг может способствовать процессу рекомбинации линейных кассет. Их важнейшее открытие заключалось в том, что эффективная рекомбинация происходит с кассетой, фланкированной участками гомологии к целевому локусу длиной всего 50 п.н. или даже меньше. Это означает, что фрагмент ДНК для встраивания может быть получен в результате всего одной ПЦР с праймерами длиной 70 оснований, из которых 20 отжигаются на матрице, содержащей ген устойчивости к антибиотику, а остальные 50 представляют собой участок гомологии. Получение интегративных

кассет путем одноэтапной ПЦР вместо конструирования на плазмидном векторе многократно ускоряет работу и дает возможность получить необходимую мутацию быстрее, чем за рабочую неделю.

После публикации этой работы лаборатория Курта стала лидирующей в области развития технологии модификации генома *E. coli* с использованием λ Red. Однако их система экспрессии *gam*, *bet* и *exo* не нашла широкого применения среди исследователей и чаще всего использовалась для дальнейшей разработки технологии. По причине того, что дефектный профаг можно перенести из штамма в штамм только при помощи неспецифической трансдукции фагом P1, а для индукции экспрессии требуется тепловой шок на водяной бане, эта система не удобна для рутинной работы. Для этих целей Даценко и Воннер (Datsenko et al., 2000) сконструировали вспомогательную плазмиду pKD46. Она содержит *gam*, *bet* и *exo* под контролем промотора P_{araBAD} , индуцирующегося при добавлении в питательную среду L-арабинозы. Конструкция основана на температурочувствительном варианте репликона pSC101 (Hashimoto-Gotoh et al., 1977), который позволяет стабильно поддерживать pKD46 в штамме при 30°C и удалять ее путем культивирования клеток в течение нескольких поколений при 42°C. Авторы также описали процедуру удаления маркера для получения немаркированной мутации путем фланкирования маркера FRT-сайтами, которые являются субстратом сайт-специфичной FLP-рекомбиназы. Технология и конструкции, предложенные авторами, распространялись свободно и сейчас применяются практически во всех лабораториях, где работают с *E. coli*, а их статья стала одной из самых цитируемых биологических публикаций с 11000 ссылок по состоянию на 2018 год. На данный момент эта технология, получившая общее название рекомбинирование (Copeland et al., 2001; Ellis et al., 2001), имеет ключевое значение для исследователей, работающих в области изучения генетики и метаболизма *E. coli*, а также в области биотехнологического применения этого объекта.

1.5.3 Параметры, влияющие на эффективность рекомбинации

Высокая частота встраивания интегративных кассет в гомологичную область хромосомы наряду с удобством использования является одним из основных факторов, определяющим широкий спектр задач, в которых применяется система λ Red. При соблюдении некоторых условий частота рекомбинации, выражающаяся в доле рекомбинантов среди выживших после трансформации клеток, может достигать 0,1-1%. Значения выше 0,1% могут быть получены только при условии использования кассеты с участками гомологии около 1000 п.н. и при избытке ДНК (Murphy, 1998), тогда как фрагменты, фланкированные гомологией длиной 50 п.н., дают типичные частоты в диапазоне между 0,0001-0,1% при трансформации 100 нг ДНК (Datsenko et al., 2000; Yu et al., 2000). После стандартной процедуры трансформации методом электропорации (Dower et al., 1988) выживают $\sim 10^8$ клеток (Yu et al., 2000). Из этого следует, что число рекомбинантов после трансформации составляет от 10^2 до 10^5 .

Как было указано выше, при уменьшении длины гомологии с 1000 до 50 п.н. эффективность падает по меньшей мере на порядок. Тем не менее, система λ Red может катализировать рекомбинацию и по участкам гомологии короче 50 п.н. Минимальная длина, при которой удается отобрать рекомбинантов, составляет 20 п.н. (Yu et al., 2000), что хорошо согласуется с *in vitro* исследованием свойств Beta, в котором было показано, что для образования стабильного нуклеофиламенты требуется не менее 16 нуклеотидов (Erler et al., 2009).

Помимо самой эффективности рекомбинации с линейным субстратом, длина гомологичных участков определяет, в какой мере на этот процесс влияют другие клеточные функции. Считается, что процесс λ Red-зависимого встраивания линейных фрагментов не зависит от RecA. Тем не менее, частота рекомбинации падает в *recA* штаммах. При этом разница между дикими и *recA* штаммами составляет от 10 раз при длине гомологии 50 п.н. (Yu et al., 2000) до 50 раз, если кассета фланкирована гомологией длиной 1000 п.н. (Murphy, 1998). Такая зависимость указывает на то, что, хотя λ Red-зависимая рекомбинация может

происходить в отсутствие RecA, данный белок также принимает участие. Возможно, он может связывать свободные 3'-концы, находить гомологию и осуществлять инвазию в гомологичный дуплекс.

Существенно на эффективность рекомбинации влияет длина интегративной кассеты. Было показано, что при увеличении длины кассеты с 1000 п.н. до 3000 п.н. эффективность рекомбинации падает в ~10 раз безотносительно молярного количества фрагмента ДНК (Maresca et al., 2010). Авторам другой работы не удалось получить рекомбинантов при длине кассеты больше 4500 п.н. Причины этого явления не совсем ясны. Это может быть связано как с механизмом встраивания кассеты, так и с тем, что длинные фрагменты менее эффективно попадают в клетку при трансформации электропорацией. Здесь нужно отметить, что, в отличие от длины кассеты, на эффективность рекомбинации практически не влияет размер делеции, по крайней мере, до 50 т.п.н. (Maresca et al., 2010).

1.5.4 Области применения технологии *λRed*

Последствия встраивания линейной кассеты в хромосому клетки зависят, во-первых, от того, что, кроме маркера устойчивости к антибиотику, содержит этот фрагмент и, во-вторых, как относительно друг друга расположены области гомологии, по которым происходит встраивание. В самом простом случае кассета несет только селективный маркер. Чаще всего это гены устойчивости к хлорамфениколу, канамицину, тетрациклину и спектиномицину/стрептомицину – *cat*, *aph*, *tetA* и *aadA* соответственно. Интегративная кассета может быть встроена между двумя соседними нуклеотидами (Ellis et al., 2001) при условии, что области гомологии на хромосоме находятся вплотную друг к другу. Их расположение на расстоянии приводит к делеции участка между ними (рис. 2). Размер делеции может составлять от 1 п.н. до, по меньшей мере, 70 т.п.н. (Hill et al., 2000). Используя этот подход авторы уже упомянутых работ сконструировали библиотеку делеционных штаммов Keio Collection (Baba et al., 2006) и получили штамм с редуцированным на ~22% геномом, который не содержал мобильных генетических элементов, криптических генов, генов, кодирующих пары токсин-

антитоксин, и других последовательностей, не имеющих значения для роста в лабораторных условиях (Mizoguchi et al., 2008).

Интегративная кассета в дополнение к селективному маркеру может содержать любую другую последовательность. Например, таким образом в составе хромосомы могут быть получены конструкции для экспрессии гетерологичных генов (Juhas et al., 2016) или транскрипционные и трансляционные фьюжны (Gerlach et al., 2007). Для получения интегративных кассет, содержащих какую-либо протяженную последовательность рядом с маркером, может применяться как клонирование на плазмидных векторах, так и сшивка нескольких фрагментов методом OE-PCR (рис. 3).

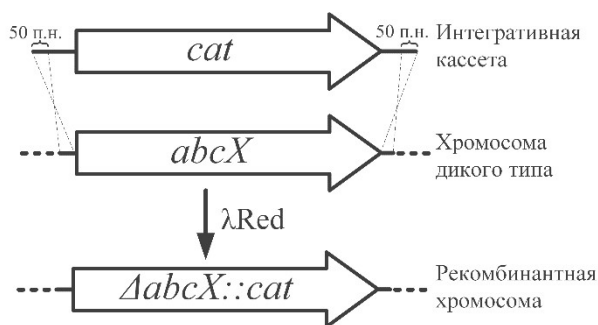


Рисунок 2. Схема получения делеции участка хромосомы путем λRed-зависимой интеграции селективного маркера. *abcX* – любой ген, *cat* – ген устойчивости к хлорамфениколу (в данном контексте – любой селективный маркер).

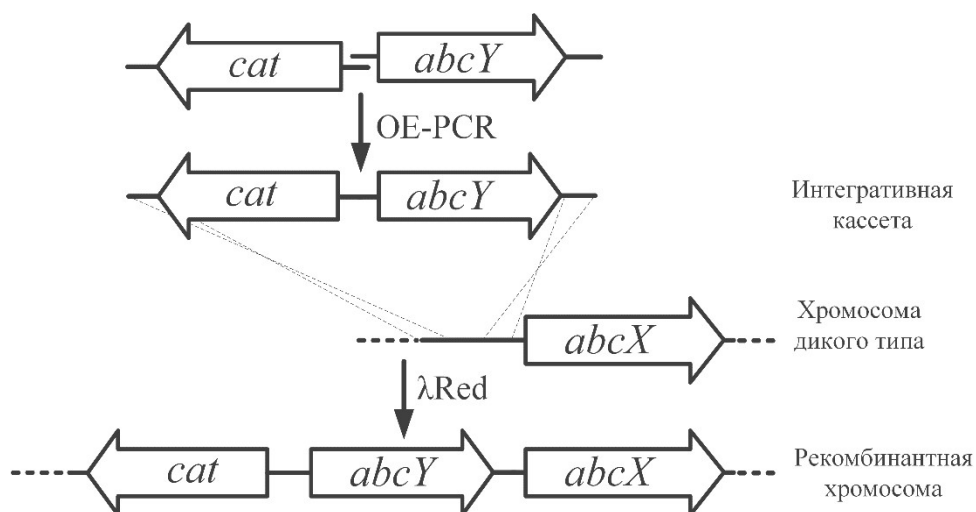


Рисунок 3. Схема λRed-зависимой интеграции хромосому гетерологичных генов совместно с селективным маркером. *abcX* и *abcY* – любые гены, *cat* – ген

устойчивости к хлорамфениколу (в данном контексте – любой селективный маркер), OE-PCR – метод сшивки линейных молекул с перекрывающимися концами путем ПЦР.

Возможности системы λ Red с успехом применяются для изменения уровня экспрессии генов, расположенных на хромосоме. Для этого перед геном интегрируют кассету, которая заменяет собой вышележащую по отношению к гену область (рис. 4). Одновременно с селективным маркером перед геном встраивают целевой промотор (конститутивный или регулируемый), а также модифицированный сайт посадки рибосомы (RBS). Таким образом, в отобранных по устойчивости к антибиотику клонах экспрессия гена (его транскрипция и трансляция) выходит из-под нативных механизмов регуляции и попадает под контроль новых регуляторных элементов.

В первую очередь, этот подход находит применение в области изучения функций гена и влияния уровня его экспрессии на функционирование клеточных систем. Часто для этого перед геном встраивают регулируемый промотор, экспрессия которого зависит от добавления в среду специфического индуктора. К таким промоторам относятся, например, $P_{LtetO-1}$ (Lutz et al., 1997), P_{araB} и P_{rhaB} (Haldimann et al., 1998). В отсутствие индуктора их активность близка к нулю и фенотипически соответствует делеции гена, а добавление индуктора в среду повышает уровень транскрипции в зависимости от концентрации. Благодаря возможности контролировать экспрессию гена составом питательной среды, регулируемый промотор заменяет в работе несколько конститутивных промоторов разной силы (Haldimann et al., 1998).

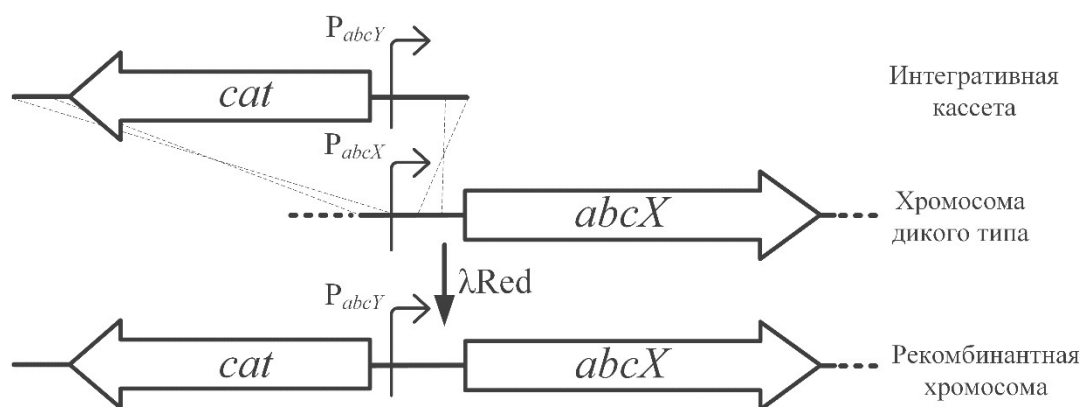


Рисунок 4. Схема замены природного промотора гена на гетерологичный. *abcX* – любой ген, P_{abcX} и P_{abcY} – природный и гетерологичный промоторы соответственно, *cat* – ген устойчивости к хлорамфениколу (в данном контексте – любой селективный маркер).

В обратной ситуации неохарактеризованный промотор может быть встроен перед геном-репортером для измерения его и силы или исследования того, как его активность зависит от условий культивирования или стадии роста культуры. Этот подход используют как для измерения силы существующих промоторов (Alper et al., 2005), так и с целью получения библиотек мутантных промоторов и RBS различной силы. Для этого вырожденные последовательности промотора и RBS вписывают в длинный праймер, по которому амплифицируют интегративную кассету с селективным маркером (Meunial-Salles et al., 2005).

Контроль экспрессии генов используют не только в фундаментальных исследованиях, но и в микробной биотехнологии. Конструирование штаммов-продуцентов требует оптимизации активности клеточных ферментов. В большинстве случаев исследователи увеличивают экспрессию генов, контролируемых ключевые этапы метаболизма целевого соединения. Для этого используют хорошо охарактеризованные сильные промоторы P_{trc} и P_{tac} (Voer de et al., 1983; Lee et al., 2007). Возможность легко заменять природные регулируемые промоторы на более сильные конститутивные при помощи λ Red-рекомбинации привела к отказу от использования нестабильных плазмидных штаммов-продуцентов, в которых оверэкспрессия биосинтетических генов достигалась путем их амплификации на многокопийных векторах.

Здесь следует заметить, что система λ Red-рекомбинация позволяет модифицировать не только геномную ДНК клетки. Рекомбини́нг является удобным инструментом по отношению к автономно реплицирующимся плазмидам (Thomason et al., 2007b). Для конструирования плазмид обычно применяют *in vitro* технику, которая включает в себя обработку ДНК эндонуклеазами рестрикции, разделение фрагментов в агарозном геле, их лигирование, трансформацию в клетки *E. coli* и отбор правильных клонов. Следовательно, конструирование существенно ограничено наличием подходящих сайтов рестрикции. В противоположность этому, рекомбини́нг *in vivo* не требует специальных сайтов, поскольку рекомбинация происходит в области гомологичных последовательностей. Рекомбини́нг может использоваться как дополнение к эндонуклеазам и лигазе, например, для внесения уникальных сайтов рестрикции или удаления лишних, так и полностью заменить их. Так, для манипуляций с сегментами генома высших эукариот используют искусственные бактериальные хромосомы (bacterial artificial chromosome, BAC). Они представляют собой низкокопийные плазмиды размером часто более 100 т.п.н. на основе F-фактора. Работать с такими большими конструкциями как с обычными плазмидами сложно по ряду причин, которые проистекают из их размера. Поэтому сейчас BAC конструируют *in vivo* при помощи λ Red системы (Warming et al., 2005; Bird et al., 2011) в соответствии с теми же подходами, которые используются для инженерии хромосомы клетки.

К конструированию автономных плазмид при посредстве λ Red системы рекомбинации имеет отношение метод *in vivo* клонирования участков хромосомы, называемый «gap-repair» (Datta et al., 2006). Обычно, когда необходимо клонировать ген или какую-либо другую последовательность, ее амплифицируют с геномной ДНК методом ПЦР, а затем полученный фрагмент лигируют с линейаризованным плазмидным вектором. Вставку полностью секвенируют, чтобы избежать случайных мутаций, которые появляются в результате амплификации. В противоположность этому, метод «gap-repair», во-первых, не требует амплификации целевого фрагмента и наличия подходящих сайтов

рестрикции, а, во-вторых, вставку, полученную таким образом, не нужно секвенировать. Технология клонирования заключается в следующем. Выбранный вектор амплифицируют по праймерам, содержащим по 50 нуклеотидов гомологии к правому и левому краю целевой последовательности на хромосоме. Продукт ПЦР должен содержать селективный маркер и ориджин репликации. Фактически он представляет собой обычную интегративную кассету с тем отличием, что фланкирующие области гомологии обращены внутрь, а не наружу по отношению к целевому локусу (рис. 5). Трансформация этого фрагмента в клетку, в которой экспрессируется λ Red, и последующая рекомбинация с хромосомой приводит к встраиванию в вектор участка хромосомы, расположенного между областями гомологии, и образованию кольцевой плазмиды. Отбор клонов ведется по устойчивости к антибиотику, поскольку вектор начинает реплицироваться только при условии замыкания в кольцо.

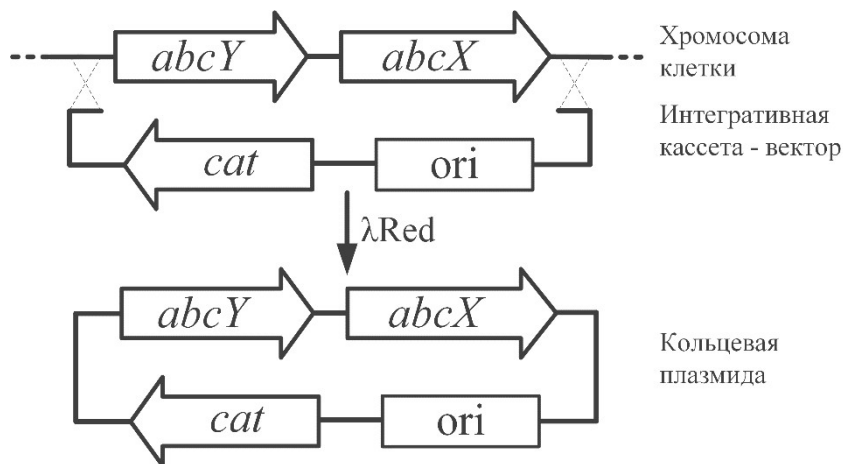


Рисунок 5. Схема *in vivo* клонирования сегментов хромосомы на автономный вектор методом «gap-repair». *abcX* и *abcY* – любые гены, *cat* – ген устойчивости к хлорамфениколу (в данном контексте – любой селективный маркер), *ori* – ориджин репликации.

1.5.5 Стратегии удаления селективного маркера и негативная селекция

Многоэтапное конструирование рекомбинантных штаммов *E. coli* часто требует повторного использования одних и тех же селективных маркеров. Из этого следует необходимость удаления маркера, интегрированного на предыдущем этапе. Наиболее удобный способ решения этой проблемы заключается во фланкировании маркера в составе интегративной кассеты

сонаправленными сайтами одной из систем сайт-специфической рекомбинации, например, FLP/FRT (Datsenko et al., 2000). Для удаления маркера в штамме, содержащем инсерцию такой кассеты, экспрессируют ген рекомбиназы FLP, что приводит к рекомбинации между двумя соседними сайтами и удалению селективного маркера, расположенного между ними. Эффективность рекомбинации достигает 90-100% (доля рекомбинантных клеток), поэтому селекция для отбора рекомбинантов не требуется. Однако этот подход имеет существенный недостаток. После несколько раундов встраивания и удаления маркеров на хромосоме остается несколько функциональных сайтов FRT, которые на следующем этапе могут рекомбинировать между собой, что потенциально приводит к массивным хромосомным перестройкам. Этого недостатка лишена система сайт-специфической рекомбинации Cre/loxP. Известны мутантные сайты lox66 и lox71, которые при рекомбинации между собой образуют один нормальный сайт loxP и один сайт, содержащий сразу две замены (Albert et al., 1995). Рекомбиназа Cre значительно менее эффективно осуществляет рекомбинацию между такими сайтами, поэтому их наличие в составе хромосомы с меньшей вероятностью ведет к перестройкам.

В любом случае, какая бы система сайт-специфической рекомбинации ни использовалась, после удаления маркера на хромосоме остается небольшой участок экзогенной последовательности, так называемый «шрам». При использовании на протяжении нескольких этапов конструирования одной и той же интегративной кассеты шрамы представляет собой повторы, по которым может проходить гомологичная рекомбинация. Этот процесс также ведет к перестройкам и нестабильности штамма. Поэтому маркер желательно удалять, не оставляя после него «шрама». Это можно сделать путем трансформации клеток фрагментом, который состоит только из двух участков гомологии и не содержит никакой последовательности между ними. Последующая λRed-рекомбинация приведет к делеции участка на хромосоме, расположенного между участками гомологии. Однако в отсутствие селекции отобрать рекомбинантные клоны достаточно трудно, потому что эффективность

рекомбинации по гомологии менее 50 п.н. редко достигает 0,1%. Поэтому для отбора используют стратегии негативной селекции. В отличие от прямой селекции, когда отбирают клетки, которые получили маркер устойчивости к антибиотикам, негативная селекция направлена на отбор клеток, потерявших какой-либо ген. При этом необходимо использовать условия, в которых растут только рекомбинантные клетки, а нерекомбинантные гибнут или не растут. Следовательно, маркер негативной селекции должен представлять собой условно-токсичный для клеток ген. Иными словами, его продукт останавливает рост клеток только в специально подобранных условиях и не влияет на жизнедеятельность в любых других. Некоторые из таких маркеров могут служить и для прямой, и для негативной селекции. К ним относится ген *galk*, кодирующий фермент галактокиназу, которая катализирует реакцию фосфорилирования D-галактозы. Мутанты по этому гену не способны утилизировать галактозу, поэтому *galk* может использоваться для прямой селекции с последующим отбором рекомбинантов на минимальной среде с галактозой. Одновременно с этим, GalK может катализировать фосфорилирование 2-дезоксигалактозы с образованием токсичного соединения 2-деокси-1-фосфогалактозы. Таким образом, *galk* позволяет отбирать рекомбинантов и при встраивании маркера, и при удалении (Warming et al., 2005). К недостаткам этого подхода относят необходимость использования штамма, мутантного по *galk*, а также селекцию на минимальной среде, на которой клетки растут намного медленнее, чем на богатой.

Ограничений в использовании богатых сред лишен маркер *rpsL*. Он кодирует S12 белок 30S субъединицы рибосомы. Именно в этом гене локализуются спонтанные мутации, дающие клетке устойчивость к стрептомицину (Traub et al., 1968). Интересно, что мерозигота, содержащая и мутантный и дикий аллель, обладает фенотипом штамма, несущего дикий аллель. То есть мутации, дающие устойчивость к стрептомицину, - рецессивны (Lederberg, 1951). На этом свойстве строится стратегия негативной селекции. Предварительно в штамме спонтанно или направленно получают мутацию в *rpsL*, придающую клеткам устойчивость к стрептомицину. В качестве интегративной

кассеты используют какой-либо ген устойчивости (например, к хлорамфениколу), соединенный с диким вариантом *rpsL*. Встраивание кассеты в хромосому устойчивого к стрептомицину штамма дает ему устойчивость к антибиотику, но одновременно с этим он становится чувствительным к стрептомицину, что позволяет затем удалить оба маркера и отобрать рекомбинантов на среде со стрептомицином.

Одна из наиболее совершенных стратегий негативной селекции основана на использовании гена *sacB* *Bacillus subtilis*. Он кодирует внеклеточный фермент левансуказу, который катализирует образование полисахарида левана из сахарозы. Экспрессия *sacB* летальна в *E. coli* на среде с сахарозой (Gay et al., 1985). Считают, что механизм токсичности заключается в избыточном накоплении левана в периплазме клетки. Стратегия удаления маркеров с использованием *sacB* в целом повторяет таковую для *rpsL* за тем исключением, что *sacB*-негативная селекция не требует предварительного получения мутаций и работает в любом штамме (Copeland et al., 2001). Из недостатков этого подхода можно отметить, во-первых, высокую частоту спонтанных мутаций в гене *sacB*, которые приводят к появлению большого количества нерекомбинантных клонов, устойчивых к сахарозе. Во-вторых, интегративные кассеты с геном *sacB* имеют размер от 3,5 до 4,5 т.п.н. Поэтому частота их встраивания намного ниже, чем у одиночных селективных маркеров (длиной 0,8-1,3 т.п.н) или кассет, содержащих *rpsL* (менее 2,0 т.п.н.).

Несмотря на недостатки, все описанные и некоторые другие (Li et al., 2005; DeVito, 2007) методы активно используются для бесшрамового получения мутаций в хромосоме *E. coli*, ВАС и плаزمиде. Для работы со штаммами чаще всего используют *sacB*, потому что этот маркер не требует особого генетического фона, тогда как другие маркеры наилучшим образом подходят для конструирования ВАС, так как в этом случае используется только один штамм-хозяин для манипуляций последовательностью *in vivo*.

1.5.6 Ограничения λ Red-рекомбинирования

Несмотря на то, что совокупность методов инженерии генома с использованием гомологичной рекомбинации λ Red активно развивается на протяжении уже более 25 лет, эта технология сохраняет ряд ограничений, связанных, прежде всего, с отсутствием эффективных и удобных методов, позволяющих интегрировать протяжённые фрагменты ДНК в бактериальную хромосому. В соответствии с представленным в научной литературе мнением, разработка таких методов затруднена в связи с тем, что эффективность интеграции линейных конструкций при посредстве Gam, Bet и Eho резко снижается с увеличением их длины (Kuhlman et al., 2010; Maresca et al., 2010). Проблему отсутствия таких подходов рассматривают как основное ограничение λ Red-рекомбинирования, вынуждающее использовать более сложные в техническом исполнении и трудоёмкие стратегии. В частности, проблему снижения эффективности рекомбинации можно частично компенсировать путём увеличения длины фланкирующих участков гомологии. В связи с тем, что участки ДНК длиннее 100 нуклеотидов невозможно добавить в последовательность праймеров, конструирование таких кассет, содержащих селективный маркер и подлежащую интеграции последовательность, требует нескольких этапов клонирования на автономных векторах (Sabri et al., 2013; Juhas et al., 2016). Однако, создание плазмид для каждого отдельного сайта интеграции делает всю процедуру громоздкой и нивелирует ключевое преимущество λ Red, заключающееся в возможности синтезировать интегративные кассеты при помощи ПЦР.

Уменьшить размер кассеты и избежать необходимости объединения целевой последовательности с селективным маркером можно путём замены прямой селекции рекомбинантных клеток негативной селекцией, направленной против нерекомбинантных. Так, например, было показано, что введение двунитевых разрывов в хромосому с помощью хоминг-эндонуклеазы I-SceI одновременно с индукцией экспрессии λ Red позволяет интегрировать фрагменты гетерологичной ДНК без использования маркеров устойчивости к антибиотикам.

Однако, для достижения этого результата интегративные кассеты необходимо вводить в клетку в составе автономных векторов (Kuhlman et al., 2010). Подходы, имеющие в своей основе CRISPR-Cas9 систему (Jinek et al., 2012; Jinek et al., 2013), сходны с таковыми, полагающимися на I-SceI. Обе стратегии подразумевают внесение двунитевого разрыва внутри или вблизи сайта интеграции с тем, чтобы клетка затем репарировала его при посредстве λ Red, используя в качестве матрицы интегративную кассету, фланкированную участками гомологии, соответствующими областям справа и слева от разрыва (Jiang et al., 2015; Pyne et al., 2015; Chung et al., 2017; Reisch et al., 2017). Таким образом, выживают лишь те клетки, которые успешно интегрируют целевую последовательность в свою хромосому. Было показано, что с использованием CRISPR-методов можно интегрировать линейные кассеты, полученные в ПЦР и фланкированные короткими участками гомологии (Jiang et al., 2015; Pyne et al., 2015; Bassalo et al., 2016). В то же время, эффективность негативной селекции, вызванной разрушением хромосомы в результате действия Cas9, может в значительной мере варьироваться в зависимости от последовательности конкретной gRNA, положения сайта внесения разрыва относительно ориджина репликации и силы промотора, контролирующего транскрипцию *cas9* (Cui et al., 2016; Zerbinì et al., 2017; Choudhury et al., 2020). Методы, полагающиеся на CRISPR-Cas9, имеют большой потенциал для инженерии генома микроорганизмов, особенно в задачах, подразумевающих модификацию нескольких мишеней одновременно. Однако, разработка надежной и эффективной процедуры интеграции гетерологичных конструкций в геном с их использованием требует подбора, оптимизации и дальнейшего стабильного поддержания целого ряда экспериментальных параметров, некоторые из которых варьируют в зависимости от сайта интеграции.

Несмотря на то, что в последнее десятилетие внимание исследователей обращено на систему CRISPR-Cas9 и методы на её основе активно разрабатываются, технология λ Red-рекомбинирования всё еще имеет незадействованный потенциал. Так, обычно для манипуляций хромосомой при посредстве λ Red используют интегративные кассеты, содержащие ген

устойчивости к антибиотикам и маркер негативной селекции (Bird et al., 2011; Li et al., 2013; Khetrapal et al., 2015; Miyazaki, 2015). Последний обычно рассматривают как вспомогательный элемент, предназначенный только для удаления и последующего повторного использования маркера устойчивости и конструирования «бесшрамовых» мутаций. Вместе с тем, эффективная негативная селекция могла бы позволить удалять интегративную кассету с одновременной интеграцией любой синтетической конструкции путём отбора рекомбинантов, выживающих в селективных условиях. Такой подход комбинирует этап удаления маркера с доставкой целевых конструкций в хромосому, в значительной степени упрощая и ускоряя получение рекомбинантных штаммов. Эта стратегия была бы более простой и надёжной по сравнению с методами, подразумевающими введение разрыва в хромосому, поскольку она основана только на λ Red-рекомбинировании как хорошо зарекомендовавшей себя и надёжной технологии и не использует вспомогательных элементов, таких как CRISPR или I-SceI. В связи с этим не возникает необходимости оптимизировать условия эксперимента и конструировать вектора, экспрессирующие уникальные gRNA для каждого целевого локуса. Наконец, применение эффективной стратегии негативной селекции предоставило бы удобную возможность для конструирования нескольких мутаций параллельно с их последующей комбинацией трансдукцией фагом P1 (Li et al., 2013; Khetrapal et al., 2015). Единственным недостающим компонентом предложенного подхода является стратегия негативной селекции, которая обеспечивала бы отбор строгий настолько, что он позволил бы различить редких рекомбинантов среди множества спонтанных мутантов, выживающих в селективных условиях. В связи с этим, настоящая работа была посвящена разработке нового достаточно эффективного метода негативной селекции и сопутствующих элементов, необходимых для реализации описанной выше стратегии интеграции в бактериальный геном.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Среды и реагенты

Культуру *E. coli* растили в жидкой среде LB (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлорид натрия – 10 г/л). LB агар готовили путем добавления к жидкой LB агар-агара до концентрации 20 г/л. Когда было необходимо, в среду добавляли антибиотики: ампициллин - 200 мг/л, хлорамфеникол – 25 мг/л, канамицин – 100 мг/л, гентамицин – 20 мг/л, стрептомицин – 20 мг/л, спектиномицин – 50 мг/л. В экспериментах с негативной селекцией *cI-hok* для штаммов, несущих модуль P_L -*cat* на многокопийной плазмиде, концентрацию хлорамфеникола увеличивали до 200 мг/л. Негативную селекцию против клеток, несущих маркеры *rpsL* и *sacB*, вели на среде LB с добавлением 500 мг/л стрептомицина и на среде SuLB (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, сахароза – 60 г/л), соответственно. Способность к утилизации сахаров тестировали на тетразолиевом агаре (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлорид натрия – 10 г/л, 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид – 25 мг/л, агар-агар - 20 г/л) с добавлением 10 г/л соответствующего сахара. Минимальную среду M9 (дигидрофосфат калия – 3 г/л, гидрофосфат натрия двенадцативодный – 15 г/л, хлорид натрия – 0,5 г/л, хлорид аммония – 1 г/л, хлорид кальция – 0,1 мМ, сульфат магния – 2 мМ, биотин – 1 мг/л, агар-агар – 20 г/л) использовали для прямой селекции рекомбинантов, способных к потреблению сахаров. Для этого в M9 вносили сахара до концентрации 4 г/л. Раствор хлорида натрия с концентрацией 9 г/л использовали для приготовления разведений суспензии клеток. Все среды стерилизовали автоклавированием при 0,5 ати в течение 15 минут. Водные растворы сахаров, IPTG, 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида отдельно стерилизовали фильтрованием через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

2.2 Ферменты и наборы

Эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК лигаза, T4 ДНК полимераза и DreamTaq ДНК полимеразы были получены из Thermo Fisher Scientific (Вильнюс, Литва). Для последующего клонирования фрагменты ДНК амплифицировали с помощью Кара HiFi ДНК полимеразы (Кара Biosystems, Вилмингтон, Массачусетс, США). T5 экзонуклеаза, Taq ДНК лигаза и Phusion ДНК полимераза, которые были использованы для приготовления смеси для изотермальной сборки Гибсона в соответствии с руководством автора (Gibson, 2011), были получены из New England Biolabs (Ипсуич, Массачусетс, США).

Плазмидную ДНК из клеток и фрагменты ДНК из агарозного геля выделяли при помощи наборов реагентов GeneJet Plasmid Miniprep Kit и GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва), соответственно.

2.3 Олигонуклеотиды

Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы в ЗАО «Евроген» и стандартным образом очищены, обессолены и лиофилизированы. Олигонуклеотиды длиной более 80 п.н. дополнительно были очищены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Номера и последовательности представлены в Приложении 1.

2.4 Бактериальные штаммы и плазмиды

Все бактериальные штаммы, использованные в настоящей работе, включая их генотипы и фенотипы, перечислены в Таблице 1. Все штаммы *E. coli*, за исключением B3996, XL1 Blue и TG1, были сконструированы на основе MG1655 (Blattner et al., 1997). Мутации, специфичные для MG1655 ($F^- \lambda^- ilvG^- rfb-50 rph-1$), были исключены из генотипа его производных. Штаммы конструировали при помощи λ Red-рекомбинирования (Datsenko et al., 2000; Bubnov et al., 2022) и трансдукции фагом P1vir (Thomason et al., 2007a). Способ конструирования каждого штамма, а именно пара праймеров и матрица для амплификации

интегративной кассеты или пара донор-реципиент для трансдукции указан в Приложении 2.

Использованные в работе плазмиды перечислены в Таблице 2. Конструирование плазмид, полученных в ходе настоящей работы, описано в следующих публикациях (Bubnov et al., 2018; Bubnov et al., 2022).

Таблица 1. Бактериальные штаммы, использованные в работе

Название штамма	Генотип	Фенотип	Источник и ссылка
MG1655	Дикий тип		Лабораторная коллекция (Blattner et al., 1997)
XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96 thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17</i>	Nal ^R Thi ⁻ Lac ⁻ Tet ^R	Лабораторная коллекция
TG1	<i>supE thi-1 Δ[lac-proAB] Δ[mcrB-hsdSM] F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Thi ⁻ Lac ⁻	Лабораторная коллекция
B3996	<i>supE ilvA442 thrC1010 Tn2555 rhtA23 tdh::Tn5 pVIC40</i>	Km ^R Sm ^R	Лабораторная коллекция (Debabov et al., 1996)
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> LT2	Дикий тип		Лабораторная коллекция (McClelland et al., 2001)
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	Дикий тип		Лабораторная коллекция (Wan et al., 2020)
B2122	<i>ΔsstT rpsL^{K43R} galK^{Tyr38TAG} araB^{Tyr57TAG} rhaB^{Tyr163TAG} ΔtdcBCDE ΔytfG::P_{trc}-pucA P_{LtetO-1}-rhtA P_{H207}-thrA^{Gly433ArgBC} Δkbl-tdh ΔyjeM::P_{H207}-thrA^{Gly433ArgBC} spoT1</i>	Sm ^R Gal ⁻ Ara ⁻ Lac ⁻	Лабораторная коллекция
<i>Pantoea ananatis</i> SC17(0)	Мутант, устойчивый к конститутивной экспрессии генов λRed, полученный из штамма <i>Pantoea ananatis</i> AJ13355		Любезно предоставлен Александром Крыловым (Исследовательский институт Аджиномото-Генетика) (Katashkina et al., 2009)
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532	Дикий тип		Любезно предоставлен Сергеем Мартяновым (ИНМИ РАН)
B1310	MG1655 λcI ⁸⁵⁷ Δ(<i>cro-attR</i>)	ts	Настоящая работа
B1411	MG1655 <i>galK::cat</i>	Gal ⁻ Cm ^R	
B1415	MG1655 <i>lacZ::cat</i>	Lac ⁻ Cm ^R	
B1733	<i>rpsL^{K43R}</i>	Sm ^R	
B1820	<i>ΔgalETKM::cat-sacB</i>	Gal ⁻ Cm ^R	
B1821	<i>ΔlacZYA::cat-sacB</i>	Lac ⁻ Cm ^R	
B1822	<i>ΔaraBAD::cat-sacB</i>	Ara ⁻ Cm ^R	

B1823	<i>rpsL^{K43R} ΔgalETKM::rpsL-cat</i>	Gal ⁻ Cm ^R
B1824	<i>rpsL^{K43R} ΔlacZYA::rpsL-cat</i>	Lac ⁻ Cm ^R
B1825	<i>rpsL^{K43R} ΔaraBAD::rpsL-cat</i>	Ara ⁻ Cm ^R
B1826	<i>ΔgalETKM::cI-hok-strA</i>	Gal ⁻ Sm ^R
B1827	<i>ΔlacZYA::cI-hok-neo</i>	Lac ⁻ Km ^R
B1828	<i>ΔlacZYA::cI-hok^{L13UAA}-neo</i>	Lac ⁻ Km ^R
B1829	<i>ΔaraBAD::cI-hok-aacC4</i>	Ara ⁻ Gm ^R
B1995	<i>ΔlacZYA::vioABCDE</i>	Lac ⁻
B2000	<i>ΔaraBAD::luxCDABE</i>	Ara ⁻
B2095	<i>ΔaraBAD::luxCDABE ΔaraC::P_{H207in}-cI-hok-neo</i>	Ara ⁻ Km ^R Ap ^R
B2096	<i>ΔaraBAD::luxCDABE ΔaraC::P_{A104in}-cI-hok-neo</i>	Ara ⁻ Km ^R Ap ^R
B2099	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-luxCDABE</i>	Ara ⁻
B2100	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{A104}-luxCDABE</i>	Ara ⁻
B2108	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{A1lacO-1}-luxCDABE</i>	Ara ⁻
B2130	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207in}-cI-hok-neo-P_{A1lacO-1}-luxCDABE</i>	Ara ⁻ Km ^R Ap ^R
B2131	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-luxCDABE</i>	Ara ⁻
B2137	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE</i>	Cm ^R
B2140	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔgalETKM::cI-hok-strA</i>	Sm ^R Ara ⁻ Gal ⁻
B2141	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔlacZYA::cI-hok-neo</i>	Km ^R Ara ⁻ Gal ⁻
B2158	<i>ΔmanXYZ::cI-hok-neo</i>	Km ^R Man ⁻
B2163	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔmanXYZ::cI-hok-neo</i>	Km ^R Ara ⁻ Man ⁻
B2211	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔsdaC::cI-hok-neo</i>	Ara ⁻ Km ^R

B2212	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔgltS::cI-hok-neo</i>	Ara ⁻ Km ^R
B2229	<i>Δ[lacI-lacZYA]::scrKYABR</i>	Lac ⁻ Scr ⁺
B1993	<i>ΔgalETKM::scrKYABR</i>	Gal ⁻ Scr ⁺
B2231	<i>Δ[araC-araBAD]::scrKYABR</i>	Ara ⁻ Scr ⁺
B2232	<i>ΔmanXYZ::scrKYABR</i>	Man ⁻ Scr ⁺
B2138	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔgalETKM::scrKYABR</i>	Gal ⁻ Scr ⁺ Cm ^R
B2193	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔlacZYA::vioABCDE</i>	Lac ⁻ Cm ^R
B2230	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE Δ[lacI-lacZYA]::scrKYABR</i>	Lac ⁻ Scr ⁺ Cm ^R
B2233	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔmanXYZ::scrKYABR</i>	Man ⁻ Scr ⁺ Cm ^R
B2234	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔsdaC::pntAB-gdhA</i>	Scr ⁺ Cm ^R
B2235	<i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI-P_{A1lacO-1}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE ΔgltS:pntAB-gdhA</i>	Scr ⁺ Cm ^R

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе

Название	Описание и назначение	Источник	Ссылка
p15A::ardA	Матрица для амплификации рамки считывания <i>ardA</i> плазмиды ColIB-P9. Несёт маркер устойчивости к хлорамфениколу и ориджин репликации p15A.	Любезно предоставлены доктором Г. Б. Завигельским (ГосНИИгенетика, Москва)	(Melkina et al., 2016)
p15A::ocr	Матрица для амплификации рамки считывания <i>T7ocr</i> . Несёт маркер устойчивости к хлорамфениколу и ориджин репликации p15A.		
pDEW201	Вектор для конструирования и тестирования транскрипционных фьюжнов между исследуемым промотором и опероном <i>luxCDABE</i> из <i>Photorhabdus luminescence</i> Nm. Несёт маркер устойчивости к хлорамфениколу и ориджин репликации pMB1.		(Van Dyk et al., 1998)
pMW- <i>trpEDCBA</i>	Несёт оперон $P_{H207-trpE^{S40F}}DCBA$, ориджин репликации pSC101 и маркер устойчивости к ампициллину	Лабораторная коллекция	
pISA	Матрица для амплификации кассеты <i>attL-aadA-attR</i> . Несёт маркеры устойчивости к спектиномицину и ампициллину. Содержит ориджин pSC101.	Лабораторная коллекция	(Vybornaya et al., 2020)
pLtet14	Матрица для амплификации конструкции <i>cat-T(0)</i> . Несёт маркер устойчивости к хлорамфениколу и ориджин репликации pMB1.	Лабораторная коллекция	
R1	Матрица для амплификации рамки считывания <i>hok</i> . Несёт маркеры устойчивости к стрептомицину, спектиномицину, хлорамфениколу, канамицину и сульфаниламидам. Принадлежит к IncF группе несовместимости.	Лабораторная коллекция	(Cox et al., 2017)
RSF1010	Матрица для амплификации рамки считывания <i>strA</i> . Несёт маркеры устойчивости к стрептомицину и сульфаниламидам. Принадлежит к группе несовместимости IncQ и способна реплицироваться в широком круге хозяев.	Лабораторная коллекция	(Scholz et al., 1989)
pKD46	Вспомогательная плазида для экспрессии функций λ Red под контролем промотора P_{araB} . Содержит в своём составе температурочувствительный ориджин репликации и маркер устойчивости к ампициллину.	Лабораторная коллекция	(Datsenko et al., 2000)
pKD13	Матрица для амплификации рамки считывания <i>neo</i> . Несёт маркер устойчивости к канамицину и ориджин R6K	Лабораторная коллекция	
pACYC184	Матрица для амплификации рамки считывания <i>cat</i> . Несёт маркер устойчивости к хлорамфениколу, тетрациклину и ориджин p15A	Лабораторная коллекция	(Chang et al., 1978)
pBR322	Среднекопийный вектор, содержит маркеры устойчивости к ампициллину и тетрациклину. Ориджин репликации – pMB1	Лабораторная коллекция	(Bolivar et al., 1977)
pOJ446	<i>Escherichia coli-Streptomyces</i> шаттл-вектор, матрица для амплификации <i>aacC4</i> . Несёт маркер устойчивости к гентамицину, ориджины репликации pMB1 и SCP2	Лабораторная коллекция	(Bierman et al., 1992)
pMW118	Малокопийный вектор, несёт ориджин репликации pSC101 и маркер устойчивости к ампициллину	Лабораторная коллекция	
pICA	Матрица для амплификации кассеты <i>cat-sacB</i> . Несёт маркеры устойчивости к хлорамфениколу и ампициллину. Содержит ориджин pMB1.	Настоящая работа	

pQEΔT	Вектор содержит IPTG-чувствительный ориджин репликации на основе ориджина pMB1 и маркер устойчивости к ампициллину	Настоящая работа	(Bubnov et al., 2018; Bubnov et al., 2022)
pPRC	Матрица для амплификации кассеты <i>rpsL-cat</i> . Несёт ориджин pSC101ts, маркеры устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу	Настоящая работа	
pTmpKm	Матрица для амплификации кассеты <i>cI-hok-neo</i> . Несёт ориджин репликации pSC101, а также маркеры устойчивости к ампициллину и канамицину	Настоящая работа	
pTmpSm	Матрица для амплификации кассеты <i>cI-hok-strA</i> . Несёт ориджин репликации pSC101, а также маркеры устойчивости к ампициллину и стрептомицину	Настоящая работа	
pTmpGm	Матрица для амплификации кассеты <i>cI-hok-aacC4</i> . Несёт ориджин репликации pSC101, а также маркеры устойчивости к ампициллину и гентамицину	Настоящая работа	
pTmpKmHok ^{L13Ochrc}	Матрица для амплификации кассеты <i>cI-hok^{L13Ochrc}-neo</i> . Рамка считывания <i>hok</i> разрушена в результате замены лейцинового кодона в 13-ом положении на стоп-кодон. В остальном идентична pTmpKm	Настоящая работа	
pTmpKmH207in	Матрица для амплификации кассеты P _{H207in} - <i>cI-hok-neo</i> . Несёт ориджин pSC101, а также маркеры устойчивости к ампициллину и канамицину	Настоящая работа	
pTmpKmH207out	Матрица для амплификации кассеты P _{H207out} - <i>cI-hok-neo</i> . Несёт ориджин pSC101, а также маркеры устойчивости к ампициллину и канамицину	Настоящая работа	
pTmpKmA1O4in	Матрица для амплификации кассеты P _{A1O4in} - <i>cI-hok-neo</i> . Несёт ориджин pSC101, а также маркеры устойчивости к ампициллину и канамицину	Настоящая работа	
pTmpKmA1O4out	Матрица для амплификации кассеты P _{A1O4out} - <i>cI-hok-neo</i> . Несёт ориджин pSC101, а также маркеры устойчивости к ампициллину и канамицину	Настоящая работа	
pDL17	Вспомогательная плазмида для экспрессии функций λRed под контролем промотора P _{rhaB} . Содержит в своём составе IPTG-чувствительный ориджин репликации, аллель <i>lacI^q</i> и маркер устойчивости к ампициллину	Настоящая работа	
pRedCm	Вспомогательная плазмида для экспрессии функций λRed под контролем промотора P _{rhaB} . Содержит модуль P _{L-cat} , который обеспечивает устойчивость к хлорамфениколу при условии отсутствия в клетке функционального CI репрессора. Несет также маркер устойчивости к ампициллину, IPTG-чувствительный ориджин репликации под контролем хромосомной копии <i>lacI</i>	Настоящая работа	
pRedCmRal	Вспомогательная плазмида для экспрессии функций λRed и антирестрикционной функции <i>λral</i> под контролем промотора P _{rhaB} . Содержит модуль P _{L-cat} , который обеспечивает устойчивость к хлорамфениколу при условии отсутствия в клетке функционального CI репрессора. Несет также маркер устойчивости к ампициллину, IPTG-чувствительный ориджин репликации под контролем хромосомной копии <i>lacI</i>	Настоящая работа	

pRedCmArdA	Вспомогательная плазмида для экспрессии функций λ Red и антирестрикционной функции <i>ardA</i> под контролем промотора P_{rhaB} . Содержит модуль P_L - <i>cat</i> , который обеспечивает устойчивость к хлорамфениколу при условии отсутствия в клетке функционального CI репрессора. Несет также маркер устойчивости к ампициллину, IPTG-чувствительный ориджин репликации под контролем хромосомной копии <i>lacI</i>	Настоящая работа	
pRedCmOcr	Вспомогательная плазмида для экспрессии функций λ Red и антирестрикционной функции $T7ocr$ под контролем промотора P_{rhaB} . Содержит модуль P_L - <i>cat</i> , который обеспечивает устойчивость к хлорамфениколу при условии отсутствия в клетке функционального CI репрессора. Несет также маркер устойчивости к ампициллину, IPTG-чувствительный ориджин репликации под контролем хромосомной копии <i>lacI</i>	Настоящая работа	
pBR- <i>vioABCDE</i>	Несёт беспромоторный оперон <i>vioABCDE Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532, фланкированный областями гомологии длиной 72 и 80 п.н. к промотору оперона <i>lacZYA</i> и С-концу <i>lacA</i> . Также содержит маркер устойчивости к тетрациклину и ориджин репликации pMB1	Настоящая работа	
pMW- <i>pntAB-aspC- asd-pycA- scrKYABR-gdhA</i>	Плазмида, несущая модуль <i>pntAB-gdhA</i> , фланкированная участками длиной 1 п.н., гомологичными областям выше и ниже кассет <i>cl-hok</i> в составе плазмид серии pTmp. Также несёт маркер устойчивости к ампициллину и ориджин репликации pSC101	Настоящая работа	
pRedCmOcr ^{SC101ts}	Вспомогательная плазмида для экспрессии функций λ Red и антирестрикционной функции $T7ocr$ под контролем промотора P_{rhaB} . Содержит модуль P_L - <i>cat</i> , который обеспечивает устойчивость к хлорамфениколу при условии отсутствия в клетке функционального CI репрессора. Несет также маркер устойчивости к ампициллину, температурочувствительный ориджин репликации pSC101 ^{ts}	Настоящая работа	
pRedCmOcr ^{RSF}	Вспомогательная плазмида для экспрессии функций λ Red и антирестрикционной функции $T7ocr$ под контролем промотора P_{rhaB} . Содержит модуль P_L - <i>cat</i> , который обеспечивает устойчивость к хлорамфениколу при условии отсутствия в клетке функционального CI репрессора. Несет также маркеры устойчивости к ампициллину, стрептомицину, хлорамфениколу и ориджин широкого круга хозяев RSF10101 температурочувствительный ориджин репликации pSC101 ^{ts}	Настоящая работа	

2.5 Приготовление электрокомпетентных клеток

Отдельную колонию целевого штамма переносили стерильной зубочисткой в 5 мл LB и растили в течение ночи. Штаммы, несущие вспомогательные плазмиды для экспрессии λ Red, растили в LB с добавлением 200 мг/л ампициллина. В экспериментах по измерению эффективности интеграции с использованием негативной селекции *cl-hok*, в среду дополнительно вносили канамицин (100 мг/л), стрептомицин (20 мг/л) или гентамицин (20 мг/л) для того, чтобы предотвратить спонтанные делеции касет *cl-hok*. Ночную культуру разбавляли в 200 раз в 10 мл свежей LB. На этом шаге концентрации ампициллина, гентамицина, канамицина и стрептомицина снижали до 100 мг/л, 5 мг/л, 25 мг/л и 5 мг/л, соответственно. Культуры инкубировали в пробирках объёмом 50 мл до тех пор, пока OD₆₀₀ не достигало 0,3-0,4 (100-110 минут). Штаммы, несущие pDL17, pRedCm, pRedCmRal, pRedCmArdA и pRedCmOcr индуцировали путём добавления 200 мкл преднагретого раствора L-рамнозы с концентрацией 200 г/л. Штаммы, содержащие хромосомный модуль *ocr- γ hexo-P_L-cat*, индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 2 мМ. В обоих случаях, клетки дополнительно инкубировали 25 минут, после чего помещали на ледяную баню. Все дальнейшие манипуляции выполняли на льду. Клетки осаждали при 8000 × g в течение 2 минут в полипропиленовых пробирках объёмом 50 мл. Супернатант сливали, пробирки центрифугировали 20 секунд и остатки среды удаляли насухо. Клетки аккуратно ресуспендировали и промывали в 35 мл деионизированной ледяной воды. Затем, клетки ресуспендировали в 1 мл воды и переносили в пробирку объёмом 1,5 мл. Пробирку центрифугировали 45 секунд в охлаждённой микроцентрифуге при 12000 × g. Супернатант удаляли насухо, после чего клетки ресуспендировали в 80 мкл ледяной деионизированной воды и использовали для электропорации в течение 1 часа. Во всех экспериментах по интегративной трансформации использовали только свежеприготовленные компетентные клетки.

Компетентные клетки штамма B1310 и штаммов, несущих pKD46, готовили сходным образом со следующими отличиями. B1310 растили при 30°C и индуцировали в течение 15 минут на водяной бане при 42°C. Клетки, содержащие pKD46, также растили при 30°C. Функции λ Red в них индуцировали путём добавления L-арабинозы до конечной концентрации 15 мМ перед сразу после разбавления ночной культуры в свежей LB.

2.6 Электропорация

Образец ДНК (1-5 мкл) добавляли к 50 мкл компетентных клеток на льду. После перешивания пипетированием клетки помещали в ледяную кювету с зазором между электродами 1 мм. Электропорацию проводили с использованием Eppendorf Electroporator 2510 (Eppendorf AG, Гамбург, Германия), работающего при 1,8 кВ, 10 мкФ и 600 Ом. Сразу же после импульса добавляли 1 мл среды LB комнатной температуры и клетки переносили в 1,5-мл пробирку для восстановления жизнеспособности.

2.7 Получение интегративных кассет

Все интегративные кассеты, за исключением *lac::vioABCDE*, *gltS::pnt-gdhA* и *sdaC::pnt-gdhA* были получены с помощью ПЦР. Используемые матрицы и пары праймеров перечислены в Таблице 3. Перед электропорацией все фрагменты ПЦР осаждали этанолом, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции DpnI для того, чтобы избавиться от следов плазмидной ДНК, и очищали с помощью препаративного гель-электрофореза и набора GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва). Чтобы избежать повреждения ДНК, для визуализации использовали УФ излучение с длиной волны 365 нм. Чистоту и концентрацию ДНК определяли путем разделения образцов в гель-электрофорезе вместе с маркером длин фрагментов ДНК 1 kb GeneRuler (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва). Аликвоты хранили при -20°C.

Кассета *lac::vioABCDE* была получена следующим образом. Плазмида *pBR-vioABCDE* была выделена из неметилирующего штамма TG1, обработана эндонуклеазами PdmI и Bst1107I. Фрагмент длиной 7525 п.н. был дефосфорилирован путём обработки щелочной фосфатазой FastAp. Кассеты *gltS::pnt-gdhA* и *sdaC::pnt-gdhA* были получены в результате обработки плазмиды *pMW-pntAB-aspC-asd-pycA-scrKYABR-gdhA*, выделенной из клеток XL1 Blue, эндонуклеазами PscI и Eam1105, после чего фрагмент длиной 21971 п.н. был затуплен ДНК-полимеразой фага T4. Обе кассеты несут фланкирующие участки, гомологичные последовательности внутри кассеты *cI-hok-neo*, интегрированной в локусы *gltS* и *sdaC*. Таким образом, локус их интеграции определен положением кассеты *cI-hok-neo*.

Таблица 3. Интегративные кассеты, использованные в работе

Кассета	Прямой праймер	Обратный праймер	Матрица
<i>ΔgalK::cat</i>	3093	3094	pACYC184
<i>ΔlacZ::cat</i>	3234	3235	
<i>ΔaraB::cat</i>	3236	3237	
<i>lacZ⁵⁰</i>	3141	3142	Геномная ДНК MG1655
<i>lacZ¹⁰⁰</i>	3143	3144	
<i>lacZ²⁰⁰</i>	3145	3146	
<i>lacZ³⁵⁰</i>	3147	3148	
<i>lacZ⁵⁰⁰</i>	3149	3150	
<i>lacZ⁶⁵⁰</i>	3151	3152	
<i>lacZ⁸⁰⁰</i>	3153	3154	
<i>lacZ¹⁰⁰⁰</i>	3155	3156	
<i>galK⁸⁵⁰</i>	3182	3183	
<i>ΔgalETKM::cat-sacB</i>	4027	4028	
<i>ΔlacZYA::cat-sacB</i>	4029	4030	pICA
<i>ΔaraBAD::cat-sacB</i>	4031	4032	pICA
<i>ΔgalETKM::rpsL-cat</i>	4027	4028	pPRC
<i>ΔlacZYA::rpsL-cat</i>	4029	4030	pPRC
<i>ΔaraBAD::rpsL-cat</i>	4031	4032	pPRC
<i>ΔgalETKM::cI-hok-strA</i>	4111	4112	pTmpSm
<i>ΔlacZYA::cI-hok-neo</i>	4113	4114	pTmpKm

<i>ΔmanXYZ::cl-hok-neo</i>	4362	4363	pTmpKm
<i>ΔaraBAD::cl-hok-aacC4</i>	4117	4118	pTmpGm
<i>ΔgltS::cl-hok-neo</i>	4765	4766	pTmpKmH207in
<i>ΔsdaC::cl-hok-neo</i>	4767	4768	pTmpKmH207in
<i>gal::scrKYABR</i>	4416	4417	pMW-pntAB-aspC-asd-pycA-scrKYABR-gdhA
<i>lac::scrKYABR</i>	4840	4841	pMW-pntAB-aspC-asd-pycA-scrKYABR-gdhA
<i>ara::luxCDABE</i>	4510	4511	pDEW201
<i>ara::scrKYAB</i>	4842	4843	pMW-pntAB-aspC-asd-pycA-scrKYABR-gdhA
<i>man::scrKYABR</i>	4839	4764	pMW-pntAB-aspC-asd-pycA-scrKYABR-gdhA
<i>lac::vioABCDE</i>	Плазмиду pBR-vioABCDE, выделенную из клеток TG1, обработали эндонуклеазами PdmI и Bst1107I. Полученный фрагмент длиной 7525 п.н. дефосфорилировали щелочной фосфатазой FastAp.		
<i>gltS::pnt-gdhA</i>	Плазмиду pMW-pntAB-aspC-asd-pycA-scrKYABR-gdhA, выделенную из клеток XL1 Blue, обработали экзонуклеазами Eam1105I и PscI. Фрагмент длиной 21971 п.н. затупили, обработав ДНК-полимеразой фага T4.		
<i>sdaC::pnt-gdhA</i>			
<i>sdaC::P_{H207}-trpE^{S40F}DCBA</i>	5376	5377	pMW-trpEDCBA
<i>gltS::P_{H207}-trpE^{S40F}DCBA</i>			pMW-trpEDCBA
<i>ΔgalETKM::cl-hok-neo</i>	5252	5253	pTmpKm
<i>ΔmanXYZ::cl-hok-neo</i>	5258	5259	
<i>ΔgalETKM::cl-hok-neo</i>	5276	5277	
<i>ΔmanXYZ::cl-hok-neo</i>	5282	5283	
<i>ΔgalTKM::cl-hok-neo</i>	5264	5265	
<i>ΔmanXYZ::cl-hok-neo</i>	5270	5271	

<i>galETKM^{wt}</i>	5256	5257	Геномная ДНК <i>Salmonella typhimurium</i> LT2
<i>manXYZ^{wt}</i>	5262	5263	
<i>galETKM^{wt}</i>	5280	5281	Геномная ДНК <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090
<i>manXYZ^{wt}</i>	5286	5287	
<i>galTKM^{wt}</i>	5268	5269	Геномная ДНК <i>Pantoea ananatis</i> SC17(0)
<i>manXYZ^{wt}</i>	5274	5275	

2.8 λ Red-зависимая интегративная трансформация

Для интеграции кассет *cat-sacB*, *rpsL-cat* и *cI-hok*, клетки трансформировали 0.1–0.2 мкг соответствующего ПЦР-продукта. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл LB и инкубировали полипропиленовой пробирке объёмом 15 мл в течение 2,5 часов при 220 об/мин перед высевом на селективную среду. При необходимости, в среду добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ для ингибирования репликации вспомогательной плазмиды. В случае кассет *cI-hok* плазмиды pRedCm и pRedCmOcr сохраняли в клетках и использовали в качестве репортёра для того, чтобы подтвердить экспрессию функционального репрессора CI путём тестирования рекомбинантных колоний на устойчивость к хлорамфениколу. Для измерения общего титра клеток, суспензию разбавляли в 10^5 раз и высевали на неселективные чашки со средой LB. Структуру рекомбинантного локуса тестировали при помощи ПЦР с колоний с использованием DreamTaq ДНК-полимеразы. Перед этим колонии рассеивали для получения отдельных клонов. В ПЦР использовали две пары праймеров, продукт для каждой из которых покрывал область стыка между последовательностью хромосомы и интегрированного фрагмента.

2.9 Интеграция посредством негативной селекции *cI-hok* и идентификация рекомбинантов

Безмаркерные каскеты интегрировали путём замены каскеты *cI-hok* с последующей негативной селекцией, направленной против нерекомбинантных клеток. Клетки трансформировали 0.4–1 мкг фрагмента ДНК, после чего ресуспендировали в 20 мл LB и растили по меньшей мере 6 часов (обычно в течение ночи) для того, чтобы в результате деления клеток истощилось внутриклеточное содержание CI и дерепрессировался модуль P_L -*cat*. Рекомбинантов отбирали на среде LB с хлорамфениколом (200 мг/л для штаммов, несущих P_L -*cat* на многокопийной плазмиде и 25 мг/л для штаммов,

содержащих эту конструкцию в хромосоме). В среду дополнительно вносили компоненты, необходимые для развития фенотипов, опосредованных оперонами *scrKYABR*, *vioABCDE* и *luxCDABE*. Рекомбинантов, способных к утилизации сахарозы подсчитывали на чашках с хлорамфениколом, 25 мг/л 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида и 10 г/л сахарозы. Клетки, трансформированные кассетой *ara::luxCDABE* высевали на чашки с хлорамфениколом, после чего 96 случайных устойчивых колоний переносили на среду LB с 2 г/л L-арабинозы, чтобы индуцировать экспрессию оперона *luxCDABE*. Люминисцирующих рекомбинантов визуализировали с помощью системы документирования гелей GelDoc Gel Documentation System (BioRad). Снимок делали без освещения с выдержкой в течение 5 минут. Рекомбинантов, несущих оперон *vioABCDE* в *lac*-локусе под контролем промотора P_{lacZ} , подсчитывали на чашках с хлорамфениколом после 2-3 дополнительных суток инкубирования на столе, необходимых для развития различной окраски. В экспериментах со штаммом B2141 и опероном *vioABCDE* в среду дополнительно вносили IPTG до конечной концентрации 10 мкМ, так как в результате повышенной экспрессии LacI (из-за наличия второй копии в составе хромосомного вспомогательного модуля) фенотип не развивался в отсутствие индукции. Рекомбинантов, которые приобрели оперон $P_{H207-trpE^{S40F}DCBA}$, отбирали на среде с хлорамфениколом. Дополнительно в среду вносили 4 г/л глюкозы для репрессии синтеза триптофаназы. Во всех экспериментах по меньшей мере семь колоний, проявляющих искомый фенотип, рассеивали, выделяли отдельные клоны и тестировали их с помощью ПЦР на наличие мутации в целевом локусе идентично тому, как описано в разделе 2.8 « λ Red-зависимая интегративная трансформация».

Протоколы интеграции *cl-hok* кассет и их удаления с отбором рекомбинантов посредством негативной селекции для *Salmonella typhimurium* LT2, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Pantoea ananatis* SC17(0) сходны с протоколами для *E. coli*. Различия между ними просуммированы в Таблице 4.

Таблица 4. Особенности работы с *Salmonella*, *Citrobacter* и *Pantoea*

Условия, отличные от оптимальных для <i>E. coli</i>	Объект		
	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	<i>Pantoea ananatis</i> SC17(0)
Культивирование и приготовление компетентных клеток			
Температура культивирования	37°C	37°C	30°C
Раствор для отмывки компетентных клеток	Деионизированная вода	Деионизированная вода	10% Глицерин
Трансформация вспомогательной плазмидой			
Вспомогательная плазида	pRedCmOcr ^{SC101ts}	pRedCmOcr	pRedCmOcr ^{RSF}
Среда для отбора трансформантов	LB + 200 мг/л ампициллина	LB + 200 мг/л ампициллина	LB + 20 мг/л стрептомицина
Температура культивирования компетентных клеток	37°C	30°C (так как при 37°C клетки <i>Citrobacter</i> образуют агрегаты в жидкой LB)	30°C
Интеграция кассеты <i>cl-hok-neo</i>			
Среда для роста ночной культуры, которую затем использовали в качестве инокулята для приготовления компетентных клеток	LB + 100 мг/л ампициллина	LB + 100 мг/л ампициллина	LB + 20 мг/л стрептомицина
Температура культивирования компетентных клеток	30°C (по причине температурной чувствительности ориджина pSC101 ^{ts})	30°C (так как при 37°C клетки <i>Citrobacter</i> образуют агрегаты в жидкой LB)	30°C
Среда для культивирования компетентных клеток	LB + 50 мг/л ампициллина	LB + 50 мг/л ампициллина	LB + 20 мг/л стрептомицина
Индукция функций λ Red и Ocr	2 mM IPTG в течение 30 минут	4 г/л L-рамноза в течение 30 минут	2 mM IPTG в течение 40-50 минут
Условия отбора рекомбинантов после трансформации кассетой <i>cl-hok-neo</i>	30°C, LB + 50 мг/л канамицина	37°C, LB + 50 мг/л канамицина	30°C, LB + 25 мг/л канамицина
Удаление кассеты <i>cl-hok-neo</i> и негативная селекция			
Среда для роста ночной культуры, которую затем использовали в качестве инокулята для приготовления компетентных клеток	LB + 100 мг/л ампициллина и 50 мг/л канамицина	LB + 100 мг/л ампициллина и 50 мг/л канамицина	LB + 20 мг/л стрептомицина и 25 мг/л канамицина
Среда для культивирования компетентных клеток	LB + 50 мг/л ампициллина и 25 мг/л канамицина	LB + 50 мг/л ампициллина и 25 мг/л канамицина	LB + 20 мг/л стрептомицина и 25 мг/л канамицина
Условия отбора рекомбинантов после удаления кассеты <i>cl-hok-neo</i>	30°C; LB + 100 мг/л хлорамфеникола + 25 мг/л 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида и 10 г/л необходимого углевода	37°C; LB + 200 мг/л хлорамфеникола + 25 мг/л 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида и 10 г/л необходимого углевода	30°C; LB + 100 мг/л хлорамфеникола + 25 мг/л 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида и 10 г/л необходимого углевода

2.10 Измерение эффективности интеграции ПЦР-продуктов

Эффективность рекомбинации с днДНК измеряли путем трансформации электрокомпетентных клеток интегративными кассетами *galK::cat*, *lacZ::cat* и *araB::cat*. Фрагменты были фланкированы участками гомологии длиной 50 п.н. к последовательности генов галактокиназы, β -галактозидазы и рибулокиназы, которые контролируют способность к утилизации D-галактозы, лактозы и L-арабинозы, соответственно. На каждую трансформацию брали по 100 нг кассеты. После электропорации клетки инкубировали в LB в пробирках объемом 1,5 мл в течение 1 часа при 37°C или в течение 2 часов при 30°C со встряхиванием при 1000 об/мин. Затем аликвоты высевали на тетразолиевый агар, дополненный соответствующим углеводом и хлорамфениколом. На этой среде рекомбинанты образовывали ярко-красные колонии, что указывало на неспособность катаболизировать присутствующий в среде сахар и успешное встраивание маркера в целевой локус.

Параллельно с высевом на селективный тетразолиевый агар, из суспензии клеток готовили серийные разведения и высевали их на неселективный LB агар для определения общего титра жизнеспособных клеток. Эффективность рекомбинации выражали как число рекомбинантов на 10^8 выживших в электропорации клеток.

2.11 Измерение стабильности репликации и эффективности удаления плазмид

Свойства pDL17 исследовали в штамме MG1655. Для измерения эффективности удаления колонию MG1655, содержащую pDL17, переносили в 20 мл среды LB с ампициллином. Когда OD_{600} достигала 0,5, суспензию клеток высевали на LB агар, содержащий 1 mM IPTG. После инкубации в течение ночи из агара вырезали три одиночные колонии, переносили их в пробирку объемом 1,5 мл и суспендировали в 0,5 мл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия. Затем из суспензии клеток готовили серийные разведения и высевали их на среду с ампициллином и на неселективные чашки

для того, чтобы определить количество устойчивых к ампициллину клеток и общий титр. Исследование стабильности репликации в отсутствие IPTG проводилось аналогичным образом. Клетки растили в жидкой среде в присутствии ампициллина и затем высевали на неселективный LB агар. После инкубации в течение ночи три колонии вырезали из агара и переносили в пробирку объемом 1,5 мл. Серийные разведения суспензии высевали на LB агар, после чего 96 отдельных колоний тестировали на устойчивость к ампициллину. Для этого их скалывали зубочистками в 96-луночный планшет и затем печатали репликатором на LB агар и LB агар с ампициллином. Эффективность удаления и стабильность репликации pQEΔT анализировали аналогично, но в качестве хозяина использовали штамм XL1-Blue, содержащий аллель *lacI^q* на F'.

2.12 Оценка способности штаммов к накоплению аминокислот

Для изучения накопления аминокислот, отдельную колонию переносили при помощи стерильной зубочистки в 50-мл пробирку, содержащую 2 мл посевной среды, г/л: дрожжевой экстракт – 35, K₂HPO₄ – 2,5, глюкоза – 2,5, NaCl – 2,5, pH – 7,2. Посевные культуры растили в течение ночи при 37 °C и 220 об/мин. На следующий день 100 мкл посевной культуры переносили в 50-мл пробирку с 2 мл ферментационной среды, г/л: (NH₄)₂SO₄ – 30, K₂HPO₄ – 2,5, лимонная кислота – 0,192, кукурузный экстракт (Roquette, Франция) – 10, FeSO₄ · 7H₂O – 0,03, MnSO₄ · H₂O – 0,02, глюкоза – 40, MgSO₄ · 7H₂O – 2, CaCO₃ – 20, pH – 7,2). Инокулированные пробирки инкубировали в течение 24 часов при 37 °C и 220 об/мин. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 13000 × g.

Супернатант разбавляли в 3 раза дистиллированной водой и анализировали содержание аминокислот с помощью ВЭЖХ. Анализ проводили с использованием системы Waters Alliance 2695, оснащенной колонками YMC-Pack Polyamine II (YMC, Киото, Япония) и смесью этилацетат:ацетонитрил:H₂O (4:46:50) в качестве подвижной фазы.

Концентрацию L-треонина и L-триптофана определяли с помощью рефрактометра Waters 2414 при 420 нм.

2.13 Удаление вспомогательных плазмид

Для удаления pDL17, pRedCm и pRedCmOsc колонии рассеивали на среде LB + 1 мМ IPTG. В этих условиях их репликация была подавлена, а образующиеся колонии состояли в основном из безплазмидных клеток, но, в то же время, содержали некоторое количество клеток, несущих нереплицирующуюся плазмиду. Эти колонии рассеивали еще раз на среде LB без добавок. Полученные одиночные колонии тестировали на устойчивость к ампициллину.

2.14 Измерение скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать в условия негативной селекции

Для флуктуационного анализа штаммы, несущие кассеты *cl-hok*, трансформировали плазмидой pRedCm. Ночную культуру тестируемого штамма разбавляли в свежей среде LB до конечной концентрации 100 клеток/мл. Штаммы, несущие pRedCm инокулировали в LB с 200 мг/л ампициллина. Общий объем засеянной среды разделяли на 20 аликвот по 2,5 мл, которые переносили в пробирки объемом 50 мл. Пробирки инкубировали в течение ночи при 220 об/мин и 37°C. Для штаммов с маркером *cl-hok* высевали по 1 или 2 мл (один и тот же объем каждого штамма и серии по 20 образцов) на LB, содержащей 200 мг/л (если вспомогательной конструкцией была pRedCm) или 25 мг/л хлорамфеникола (для штаммов с хромосомным модулем *osc-γβexo-P_L-cat*). В случае со штаммами, несущими маркеры *rpsL* и *sacB*, культуры разбавляли в 10 раз и аликвоту объемом 100 мкл высевали на LB с 500 мг/л стрептомицина и среду SuLB соответственно. Для измерения общего титра клеток в культуре, в каждой серии по 20 пробирок три образца разбавляли в 10⁶ раз и 100 мкл высевали на неселективную среду LB. Мутантов, выживших в условиях негативной селекции, и общий титр

подсчитывали через 24 часа инкубирования при 37°C. Значение титра клеток во всех пробирках серии считали равным значению, полученному в результате усреднения значений трех образцов. Скорость возникновения спонтанных мутаций определяли методом максимального правдоподобия Ма-Сандри-Саркара (Sarkar et al., 1992), доверительный интервал рассчитывали как было описано ранее (Foster, 2006). Данные анализировали с использованием FluCalc (Radchenko et al., 2018). Если несколько образцов серии не содержали ни одного мутанта и отношение количества таких образцов к общему количеству находилось в диапазоне от 0,1 до 0,7, то для определения среднего числа мутаций на образец (m) использовали $p\theta$ -метод Лурия и Дельбрюка (Luria et al., 1943). Скорость возникновения мутаций (μ) рассчитывали путём деления m на общее количество клеточных делений, которое считали численно равным числу клеток, высеянных на селективную среду (Foster, 2006). Если высевали не весь образец, а его часть, то значение скорости корректировали путём умножения на фактор эффективности посева. 95% доверительный интервал рассчитывали с использованием F-статистики. Обе величины рассчитывали как описано ранее (Foster, 2006).

2.15 Измерение эффективности посева фага λ

Суспензию фага λ готовили с использованием штамма B1270 (MG1655, лизогенизированный фагом λcI^{857}). Клетки растили в течение ночи в LB при 30°C. Затем культуру разбавляли в 200 раз и растили при той же температуре до достижения OD_{600} 0,3–0,4, после чего клетки переносили на качалку в водяной бане и инкубировали 2 часа при 42°C. Аликвоту объёмом 1 мл смешивали со 100 мкл хлороформа, вортиксовали, после чего центрифугировали 1 минуту при $12000 \times g$. Верхнюю фазу отбирали и хранили при 4°C. Суспензию неметилированного фага λ ($\lambda.0$) готовили путём инфицирования штамма TG1, у которого отсутствует активность метилтрансферазы EcoKI.

Титр в суспензии определяли путём высева фага на газон клеток и подсчёта числа стерильных блюшек. Серийные 10-кратные разведения фага готовили в 0,9% растворе хлорида натрия. Аликвоту суспензии фага объёмом 100 мкл смешивали с 200 мкл клеточной суспензии. Затем смесь добавляли к 5 мл расплавленного и охлаждённого до 45°C полужидкого агара (LB с 0,75% агара) и распределяли по поверхности преднагретой до 37°C чашки со средой LB. Полученные чашки инкубировали при 37°C в течение ночи, после чего подсчитывали стерильные блюшки. Культуру штамма-хозяина для высева фага растили так же, как для приготовления электрокомпетентных клеток. Эксперименты по определению эффективности высева на клетки, несущие плазмиды pRedCm, pRedCmRal, pRedCmArdA и pRedCmOcr проводили параллельно с экспериментами по определению эффективности интеграции кассеты *gal::scrKYABR*. Таким образом, одну и ту же культуру использовали для приготовления компетентных клеток и высева фага. Аликвоту для определения эффективности высева отбирали сразу после того, как клетки после индукции помещали на водяную баню.

2.16 Измерение роста клеток и *in vivo* люминесценции

Отдельную колонию исследуемого штамма переносили в 5 мл LB без добавок и растили в течение ночи. Ночную культуру разбавляли в свежей LB так, что начальное значение OD₆₀₀ составляло 0,004. При необходимости в нулевой момент времени кривой роста вносили IPTG до конечной концентрации 1 мМ для индукции LacI-репресслируемых промоторов. Затем по 200 мкл засеянной среды переносили в лунки 96-луночного планшета с черными стенками (Greiner Bio-One, каталожный номер 665096). Внешние лунки заполняли водой, чтобы минимизировать краевой эффект. Для каждого штамма шесть лунок использовали в качестве технических повторностей. Штаммы располагали в порядке убывания силы промотора перед *lux*-репортёром, чтобы минимизировать взаимное влияние образцов. Лунку со стерильной LB использовали в качестве контроля. Планшеты инкубировали

при 37°C и 600 об/мин в люминометре CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия). Значения OD₆₀₀ и люминесценции (RLU) измеряли каждые 15 минут. Люминесценцию измеряли без фильтров.

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения MARS (BMG Labtech, Германия). Значения OD₆₀₀ и люминесценции контрольного образца вычитали из значений опыта, после чего значения люминесценции делили на оптическую плотность. Нормализованную величину RLU/OD₆₀₀ усредняли и рассчитывали стандартное отклонение. Для расчёта скорости роста культуры (μ , ч⁻¹) величину RLU/OD₆₀₀ логарифмировали и определяли отрезок, внутри которого $\ln(\text{RLU}/\text{OD}_{600})$ проявляет линейную зависимость от времени. На этом отрезке, значения аппроксимировали с помощью линейной регрессии и использовали угол наклона полученной прямой в качестве μ . Время удвоения (t, мин) рассчитывали по следующей формуле: $t = \frac{60 \cdot \ln 2}{\mu}$.

2.17 Перенос немаркированных геномных локусов между штаммами

Штаммы, несущие кассеты *cl-hok* в локусах *gal*, *lac*, *ara* и *tan* использовали в качестве реципиентов для трансдукции фагом P1_{vir}. Модуль P_L-*cat* находился на pRedCmOcr или в составе хромосомной вспомогательной конструкции *ocr-γβexo-P_L-cat*. В случае успешного переноса дикого локуса из MG1655 в этих штаммах восстанавливалась способность утилизировать соответствующие сахара, что позволяло различать рекомбинантов среди спонтанных мутантов, устойчивых к хлорамфениколу.

Отдельную колонию исследуемого штамма скалывали в 5 мл LB. В зависимости от штамма в среду вносили ампициллин (200 мг/л) для поддержания pRedCmOcr, а также, при необходимости, канамицин (100 мг/л), гентамицин (20 мг/л) и стрептомицин (20 мг/л). На следующий день культуры разбавляли в 100 раз в LB с такими же антибиотиками с тем лишь исключением, что концентрацию ампициллина снижали до 100 мг/л.

Культуры инкубировали до достижения OD_{600} 0,6-0,8. Клетки отделяли центрифугированием, и ресуспендировали в 2 мл буфера MC (100 мМ $MgSO_4$, 5 мМ $CaCl_2$) и инкубировали 20 минут при 220 об/мин и комнатной температуре. Аликвоту суспензии объёмом 200 мкл переносили в 1,5-мл пробирку и смешивали с 0.5×10^8 – 1.0×10^8 частиц P1vir, полученных в результате инфекции штамма-донора. Смесь инкубировали 20 минут при 37°C с перемешиванием при 1000 об/мин. Инфекцию останавливали путём разбавления суспензии в 20 мл LB с цитратом (167 мМ). Суспензию инкубировали в течение ночи, после чего высевали на чашки LB с хлорамфениколом (200 мг/л или 25 мг/л в зависимости от того, pRedCmOcr или хромосомный модуль использовали в качестве вспомогательной конструкции). В среду дополнительно вносили цитрат натрия (10 мМ), чтобы предотвратить адсорбцию фага, а также 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид (25 мг/л) и соответствующий углевод (10 г/л), что позволяло различать Gal⁺, Ara⁺ и Man⁺ рекомбинантов. Лактоза ингибирует репликацию pRedCmOcr и индуцирует конститутивную экспрессию оперона *ocr-yβexh* в составе хромосомного вспомогательного модуля. Поэтому после инфекции фагом клетки штаммов B1827 и B2141 сначала высевали на LB с хлорамфениколом и цитратом, а затем появившиеся колонии скалывали и переносили репликатором на индикаторные чашки с тетразолием и лактозой для подсчёта доли рекомбинантов. В экспериментах со штаммом B2141 в среду дополнительно вносили IPTG до конечной концентрации 1 мМ, так как в результате высокого уровня экспрессии LacI *lac*-оперон в этом штамме частично нечувствителен к индукции лактозой.

В качестве альтернативного способа переноса дикого локуса использовали трансформацию клеток геномной ДНК донора. Для этого геномную ДНК выделяли с помощью GeneJet Genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва). В соответствии с руководством производителя, в результате этой процедуры ДНК фрагментируется и средний размер фрагмента составляет 30 т.п.н. Полученную ДНК концентрировали с

использованием Monarch PCR & DNA cleanup kit (New England Biolabs, США). Перед тем, как смыть ДНК, колонки дополнительно промывали ледяным 70% этанолом. Концентрация конечного образца обычно составляла 0,4–0,5 мкг/мкл. Компетентные клетки готовили как описано в разделе 2.5 «Приготовление электрокомпетентных клеток», после чего трансформировали 2–2.5 мкг геномной ДНК. Дальнейшие процедуры восстановления жизнеспособности клеток, посева, отбора и идентификации рекомбинантов проводили, как и в экспериментах с трансдукцией P1 *vir* с тем лишь исключением, что в среду не вносили цитрат.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ¹

3.1 Создание вспомогательных конструкций для экспрессии генов

Red

Ключевой составляющей элемент технологии редактирования генома на основе Red рекомбинации – генетические конструкции, служащие для экспрессии генов γ , β и *exo* фага λ в бактериальной клетке. С этой целью используют конструкции двух типов – дефектный профаг λ , интегрированный в хромосому (Ellis et al., 2001), и автономные вспомогательные плазмиды (Datsenko et al., 2000; Murphy, 2016). Главное преимущество плазмид перед профагом состоит в том, что они могут быть легко введены в клетки любого целевого штамма. Вместе с тем, возможность легко удалить их из клетки требует использования специальных ориджинов репликации, активность которых зависит от условий культивирования. Среди подобных репликонов известны производные от pSC101 и RK2. Их особенность заключается в том, они содержат в своем составе гены, продукты которых необходимы для инициации репликации (*repA* – pSC101, *trfA* – RK2). В этих генах были получены ts-мутации, ведущие к нестабильности соответствующего белка при повышенной (непермиссивной) температуре (Hashimoto-Gotoh et al., 1977;

¹ Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

1. **Bubnov D. M.**, Yuzbashev T. V., Khozov A. A., Melkina O. E., Vybornaya T. V., Stan G. B., Sineoky S. P. Robust counterselection and advanced λ Red recombineering enable markerless chromosomal integration of large heterologous constructs // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50. № 15. P. 8947–8960. DOI: doi.org/10.1093/nar/gkac649 (WOS IF 14,9; SJR IF 8,23; Q1) (0,88/0,74) (Здесь и далее в скобках приведён объем публикаций в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. **Bubnov D. M.**, Yuzbashev T. V., Vybornaya T. V., Netrusov A. I., Sineoky S. P. Excision of selectable markers from Escherichia coli genome without counterselection using an optimized λ Red recombineering procedure // *Journal of microbiological methods*. 2019. V. 158. P. 86–92. DOI: doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.022 (WOS IF 2,2; SJR IF 0,47; Q3) (0,44/0,40).

3. **Bubnov D. M.**, Yuzbashev T. V., Vybornaya T. V., Netrusov A. I., Sineoky S. P. Development of new versatile plasmid-based systems for λ Red-mediated Escherichia coli genome engineering // *Journal of Microbiological Methods*. 2018. V. 151. P. 48–56. DOI: doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.001 (WOS IF 2,2; SJR IF 0,47; Q3) (0,56/0,47).

Naugan et al., 1992). Таким образом, плазмиды на основе мутантных репликонов pSC101^{ts} и RK2^{ts} стабильно поддерживаются в клетках при перmissive температуре, а при nonpermissive активности репликации снижается, вследствие чего падает число копий и в культуре с высокой частотой появляются безплазмидные клетки. Поэтому указанные репликоны служат основой для подавляющего большинства описанных в литературе вспомогательных плазмид, которые используются для экспрессии генов системы λRed (Murphy, 2016). Эти плазмиды можно поддерживать в штамме, сколько требуется, а затем удалить путем нескольких пассажей в nonpermissive условиях. Однако, стабильная репликация возможна только при 30°C, в результате чего для поддержания плазмиды в клетках их нужно культивировать при permissive температуре, при которой скорость роста культуры снижается в ~1,5 раза (Herendeen et al., 1979). По этой причине существенно увеличивается длительность всех манипуляций, особенно, если исходный штамм имел сниженную жизнеспособность и скорость роста. В этом случае, время инкубирования, необходимое для получения изолированных колоний может возрасти до 2-3 суток. Поэтому первой задачей настоящей работы была разработка плазмидного вектора, репликация которого находилась бы под контролем других внешних факторов. Наилучшим образом для этого подходит состав питательной среды, который можно легко варьировать, например, добавляя в среду химические соединения – индукторы специфических промоторов.

Для конструирования вектора был выбран ColE1-подобный ориджин широко распространенного плазмидного вектора pBR322 по причине того, что механизм его работы хорошо известен (Davison, 1984; Cesareni et al., 1991). Минимальный ориджин pBR322 имеет длину ~600 п.н. и кодирует два взаимокomплементарных транскрипта. Первый транскрипт длиной 555 нуклеотидов носит название RNAII. Его 3'-конец служит РНК-праймером для инициации репликации плазмиды при участии ДНК полимеразы I. Образование ДНК-РНК гибрида в кодирующей RNAII области зависит от

сложной вторичной структуры молекулы РНК. Второй транскрипт, RNAI, имеет длину ~108 нуклеотидов. Он полностью комплементарен области на 5'-конце RNAII. Промотор, контролирующий синтез RNAI, приблизительно в 10 раз сильнее промотора RNAII (Stuber et al., 1981), благодаря чему короткий транскрипт находится в большом избытке. Его роль заключается в связывании RNAII. В результате функциональная вторичная структура не образуется, и инициация репликации ингибируется. Взаимодействие RNAII и RNAI усиливается в присутствии небольшого белка ROP, ген которого также находится на pBR322 вблизи от точки начала репликации. Таким образом, активность ориджина и число копий pBR322 на клетку контролируется соотношением концентраций RNAI и RNAII, а также наличием ROP. В отсутствие этого белка число копий увеличивается в 3-5 раз (Tomizawa et al., 1984), что соответствует приблизительно 120-200 копиям на клетку, учитывая, что полноценная pBR322 имеет около 40 копий (Stueber et al., 1982).

В работе были использованы наблюдения нескольких авторов, которые заключались в том, что наличие вблизи точки начала репликации сильного конститутивного промотора, иницирующего сонаправленную с RNAI транскрипцию, снижает число копий плазмиды в клетке (Stueber et al., 1982; Kwon et al., 1998). Потенциально, если среднее число копий упадет ниже одной, то в культуре появятся безплазмидные клетки. Для того, что проверить эту гипотезу, был использован экспрессионный вектор pQE30 (Qiagen). Эта плаزمида содержит ориджин pBR322 без гена *rop*, гены устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу *bla* и *cat*, и сильный искусственный промотор $P_{T5/lacO}$, активность которого находится под контролем хромосомной копии гена *lacI* (рис. 6).

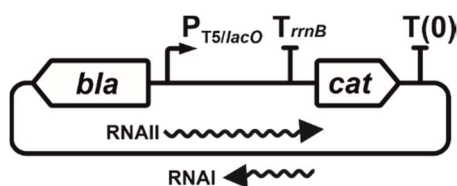


Рисунок 6. Схематическая карта pQE30. $T(0)$ и T_{rrnB} – терминаторы транскрипции, *bla* и *cat* – гены устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу соответственно.

Между промотором и ориджином располагаются два терминатора транскрипции – T(0) и T_{rrnB}. Поэтому, для того, чтобы проверить, может ли активность промотора влиять на стабильность репликации, участок ДНК, содержащий оба терминатора и *cat*, был удален. В результате этого на полученной конструкции рQEΔT промотор P_{T5/lacO} был помещен на расстоянии ~300 п.н. от 3'-конца RNAII (рис. 7).

Для того, чтобы оценить эффект активности промотора на стабильность плазмиды, клетки штамма XL1-Blue, содержащего рQEΔT, рассеивали на LB агаре с добавлением IPTG в концентрации 1 мМ и затем анализировали полученные отдельные колонии с целью определить долю плазмидосодержащих клеток внутри них. Результаты приведены в Таблице 5.

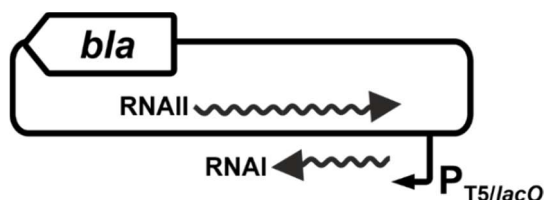


Рисунок 7. Схематическая карта рQEΔT.

Среди $\sim 5 \times 10^7$ клеток, которые составляют отдельную колонию, было менее 100 устойчивых к ампициллину клеток, несущих плазмиду. Тот факт, что в каждой протестированной колонии количество Ap^R клеток численно не превышало копийности рQEΔT (исходя из оценки копийности рBR322-подобных плазмид в отсутствие гена *rop*), означает, что в присутствии IPTG репликация полностью ингибируется вследствие активности промотора P_{T5/lacO}.

Потенциальных механизмов ингибирования репликации рQEΔT в результате дерепрессии P_{T5/lacO} может быть два. Во-первых, поскольку синтезируемый с P_{T5/lacO} транскрипт содержит полную RNAI, он может ингибировать образование праймера и инициацию репликации в соответствии с природным механизмом. Вторая возможность заключается в том, что P_{T5/lacO} и промотор RNAII могут интерферировать между собой, как это показано для направленных друг на друга промоторов в *E. coli* (Callen et al., 2004). Механизм

интерференции конвергентных промоторов основан не на взаимодействии их транскриптов, а на том, что инициация транскрипции со слабого промотора может происходить в несколько раз реже, если активный синтез РНК происходит на противоположной цепи. Таким образом, активный $P_{T5/lacO}$ может снижать количество синтезируемой RNAII. Провести различие между этими двумя возможностями можно было бы путем сравнения влияния промотора $P_{T5/lacO}$ на репликацию в *cis*- и *trans*-положении.

Стабильность рQEΔT тестировали таким же образом в отсутствие IPTG. В этих условиях LacI, который экспрессируется с хромосомной копии *lacI*, связывается с последовательностями *lacO* в промоторе $P_{T5/lacO}$ и репрессирует его. В колониях, изолированных на LB агаре менее 5% клеток потеряли плазмиду (Таблица 5). Это означает, что рQEΔT без давления отбора со стороны ампициллина достаточно стабильно реплицируется и поддерживается в культуре на протяжении ~24 генераций, необходимых для появления колонии из одиночной клетки. Учитывая, что обычно в лабораторной практике антибиотики всегда добавляют в среду для поддержания плазмид, небольшое отклонение значения стабильности от 100% не является серьезным недостатком. Поэтому в дальнейшем вектор рQEΔT был использован для конструирования вспомогательных плазмид, несущих гены λ Red.

Таблица 5. Стабильность репликации и эффективность удаления плазмид

Плаزمида	Эффективность удаления*	Стабильность репликации, %**
рQEΔT	< 20***	95,1 (0,57)
рDL17	$1,4 \times 10^3$ ($1,3 \times 10^3$)	89,7 (1,50)

* - указанные значения представляют собой число Ap^R клеток на 10^7 клеток в колонии, изолированной на LB агаре с 1 мМ IPTG. Данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение (в скобках) трех независимых экспериментов.

** - указанные значения представляют собой долю Ap^R клеток в колонии, изолированной на LB агаре без IPTG. Данные представлены как среднее

значение и стандартное отклонение (в скобках) трех независимых экспериментов.

*** - Ap^R клеток не было обнаружено среди 5×10^5 клеток, высеянных на LB агар с ампициллином.

Поскольку конститутивная экспрессия λ Red приводит к гибели клетки, транскрипция этих генов должна находиться под контролем регулируемого промотора, который имеет низкий уровень базальной активности в отсутствие индукции. Но при этом он должен быть достаточно сильным для того, чтобы обеспечить насыщающий с точки зрения эффективности рекомбинации уровень синтеза Gam, Bet и Exo. Исходя из этих требований был выбран промотор P_{rhaB} , под контролем которого находятся гены, контролирующие утилизацию L-рамнозы. В регуляции его активности участвуют два активатора транскрипции, RhaS и RhaR (Egan et al., 1993). Оба белка связываются с молекулами L-рамнозы и в таком состоянии взаимодействуют с промоторами. RhaR активирует транскрипцию оперона *rhaSR*, тогда как RhaS связывается с промотором P_{rhaB} . Таким образом, при добавлении в среду L-рамнозы в клетке запускается двухступенчатая индукция, приводящая к активации P_{rhaB} . Благодаря такому устройству регуляторного механизма достигается очень низкий уровень базальной активности промотора. Опосредованное сравнение через силу *lac*-промотора показывает, что в отсутствие индукции P_{rhaB} инициирует транскрипцию в ~ 50 раз реже, чем P_L фага λ , под контролем которого в норме находится экспрессия λ Red (Lanzer et al., 1988; Egan et al., 1993). Благодаря этому P_{rhaB} мог бы обеспечить достаточно строгий контроль экспрессии λ Red на многокопийной плазмиде.

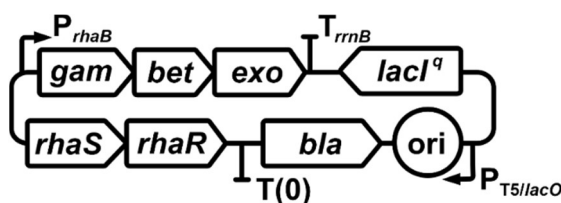


Рисунок 8. Схематическая карта pDL17.

В соответствии с этими рассуждениями на основе вектора pQEΔT была сконструирована плаزمида pDL17 (рис. 8). Для того, чтобы pDL17 могла

стабильно реплицироваться в клетках вне зависимости от генотипа штамма, эта конструкция дополнительно перед промотором $P_{T5/lacO}$ содержит аллель $lacI^q$, который отличается от дикого заменой в области -35 промотора и в ~10 раз большим уровнем синтеза репрессора LacI (Muller-Hill et al., 1968). Стабильность репликации и эффективность удаления конструкции в ответ на добавление IPTG в среду были измерены также, как и для pQEΔT, за исключением того, что измерения проводились на диком штамме MG1655 (Таблица 5). Как видно из результатов измерения, эффективность удаления значительно снизилась в результате того, что в случае pDL17 $lacI^q$ присутствует в клетке в 100-200 копиях, тогда как в клетках XL1-Blue с pQEΔT имеется всего одна копия в составе хромосомы. По-видимому, высокая концентрация LacI не позволяет полностью снять репрессию с $P_{T5/lacO}$ даже при добавлении среды IPTG до концентрации в 1 мМ. В противоположность ожиданиям стабильность репликации в отсутствие IPTG также снизилась. Небольшую разницу между pQEΔT и pDL17 можно объяснить токсичностью генов под контролем P_{rhaB} , которые, находясь на многокопийной плазмиде, на низком уровне могут экспрессироваться даже в отсутствие L-рамнозы. Вторая возможная причина не исключает первой и заключается в возросшей нагрузке на репликативный аппарат клетки, в результате чего безплазмидные клетки могут получить преимущество в скорости роста.

На pDL17 промотор $P_{T5/lacO}$ сонаправлен с генами λ Red. Несмотря на то, что их разделяет около 4 т.п.н., добавление IPTG для удаления плазмид из клеток может приводить к активации транскрипции *gam*, *bet* и *exo*. Для того, чтобы избежать этого, между *bla* и *rhaR* был встроены сильный терминатор транскрипции T(0). Таким образом, полученная конструкция имеет полностью независимые как друг от друга, так и от температуры механизмы контроля репликации и экспрессии генов Red.

Для измерения эффективности рекомбинации в клетках, несущих pDL17, в первую очередь оптимизировали уровень экспрессии λ Red. Для этого клетки MG1655[pDL17] индуцировали L-рамнозой с конечной концентрацией

4 г/л (Wilms et al., 2001) и варьировали время индукции. Компетентные клетки трансформировали 100 нг кассеты *galK::cat*, после чего подсчитывали рекомбинантные Gal⁻ Cm^R колонии и общий титр живых клеток (рис. 9). Эффективность оценивали с точки зрения общего числа рекомбинантов и их доли среди всех клеток. В отсутствие индукции устойчивые с хлорамфениколу колонии не были обнаружены. Рекомбинанты появлялись уже после пятиминутной индукции, и их число увеличивалось вплоть до точки 20 минут, где количество рекомбинантов составляло более 2×10^4 на 10^8 живых клеток. Дальнейшее увеличение времени индукции до 60 минут приводило к небольшому росту доли рекомбинантов, но их общее количество и титр живых клеток в культуре падали в 4-5 раз. Это свидетельствует о том, что pDL17 способна обеспечивать уровень экспрессии Red выше, чем тот, что необходим для получения максимальной эффективности рекомбинации. Его превышение ведет к падению жизнеспособности клеток и общего количества рекомбинантов. Поэтому в качестве оптимального значения в дальнейшей работе клетки индуцировали в течение 20 минут.

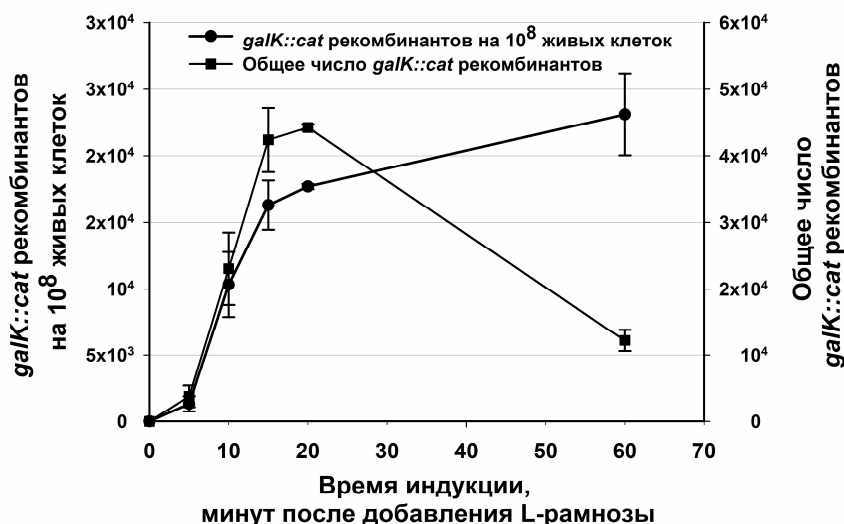


Рисунок 9. Влияние времени индукции λ Red на эффективность интеграции. Культуры штамма MG1655[pDL17] индуцировали в течение указанных промежутков времени путем добавления в среду L-рамнозы. После этого, клетки делали электрокомпетентными как описано в разделе 2.7 «Приготовление компетентных клеток для интегративной трансформации» и трансформировали 100 нг кассеты *galK::cat*. Рекомбинантов отбирали на тетразолиевом агаре с галактозой и хлорамфениколом. Значения

представляют собой среднее трех независимых экспериментов, планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

После того, как были определены оптимальные условия для индукции Red при использовании pDL17, эту конструкцию сравнили по эффективности рекомбинации с широко используемой вспомогательной плазмидой pKD46 и, в качестве положительного контроля, со штаммом B1310, содержащим дефектный профаг λ . Штаммом-хозяином для pDL17 и pKD46 выступал MG1655, изогенный по отношению к B1310. Для трансформации использовали три различных интегративных кассеты: *galK::cat*, *lacZ::cat* и *araB::cat* (рис. 10). Из результатов этого эксперимента следовало, что pDL17 и профаг обеспечивают приблизительно равную эффективность рекомбинации. При этом она была значительно выше по сравнению со значениями, полученными в экспериментах с MG1655[pKD46].

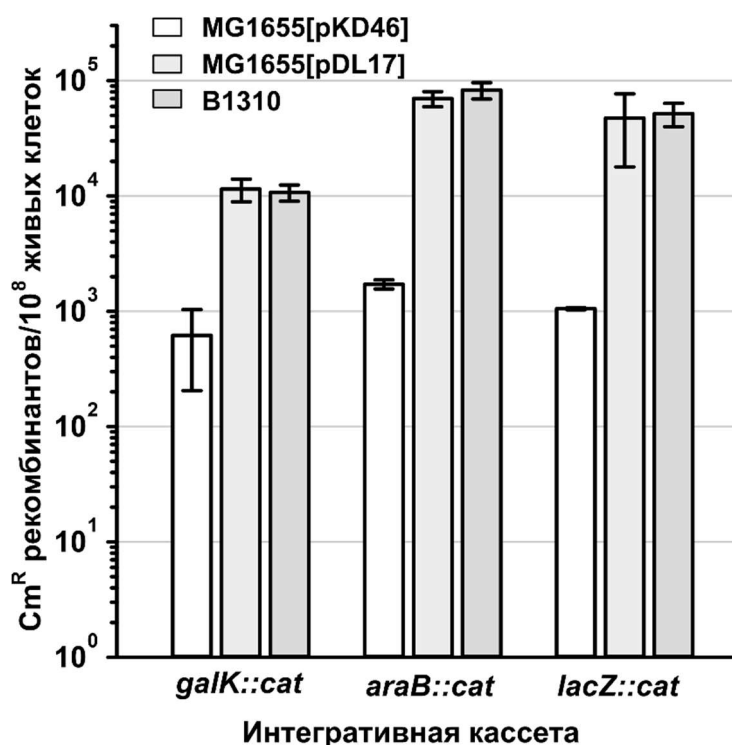


Рисунок 10. Сравнение эффективности рекомбинации в штаммах, несущих pDL17, pKD46 и дефектный профаг. Культуру штамма MG1655[pDL17] индуцировали в течение 20 минут. Трансформировали по 100 нг *cat*-кассет. Рекомбинантов отбирали на тетразолиевом агаре с хлорамфениколом. Значения представляют собой среднее трех независимых экспериментов, планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

3.2 Интеграция фрагментов ДНК без селекции

В предыдущем эксперименте одна из интегративных кассет, *lacZ::cat*, встраивалась в хромосому клетки с эффективностью, которая составляла около 6×10^4 рекомбинантов на 10^8 выживших после электропорации клеток. Таким образом, доля рекомбинантов составляла 0,06%. Увеличение доли по крайней мере до 1% сделало бы возможным неселективный отбор рекомбинантов, например, с помощью ПЦР с колоний.

На Рисунке 11 представлена форма зависимости вероятности найти хотя бы один рекомбинантный клон среди 100 случайных колоний от доли рекомбинантов. Из представленных значений следует, что вероятность успешного исхода скрининга превышает 95% при увеличении доли рекомбинантов до 3% от общего числа клеток. Для достижения этого есть две возможности. Во-первых, в случае отсутствия селективного маркера интегративная кассета может состоять только из областей гомологии, которые соответствуют участкам хромосомы, фланкирующим будущую делецию. Благодаря этому снижается общая длина кассеты, в результате чего должна увеличиться эффективность рекомбинации. Во-вторых, известно, что при увеличении длины участков гомологии к мишени на хромосоме увеличивается эффективность рекомбинации (Yu et al., 2000). Таким образом, повысить эффективность рекомбинации можно, увеличивая длину областей гомологии и снижая общую длину кассеты. Однако, два этих фактора действуют на эффективность в противоположных направлениях, так как при увеличении длины областей гомологии растет общая длина фрагмента. Поэтому, при увеличении длины гомологии доля рекомбинантных клонов может расти либо непрерывно с замедлением, либо зависимость может быть куполообразной и иметь максимум.

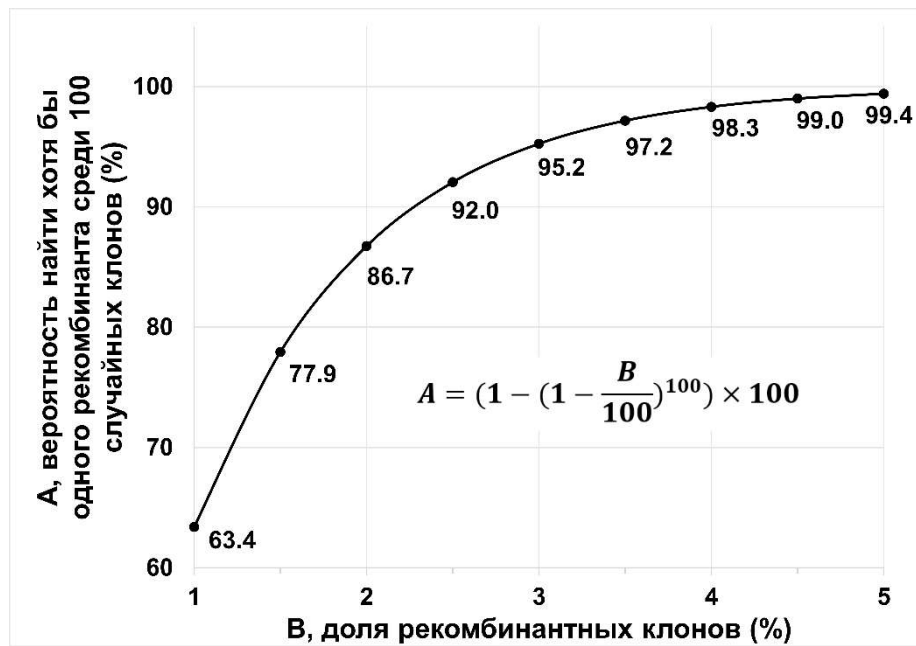


Рисунок 11. Зависимость вероятности найти хотя бы один рекомбинантный клон среди 100 случайно выбранных (А) от доли рекомбинантов (В). Обе величины выражены в процентах. На графике указана функция зависимости А от В, в соответствии с которой были рассчитаны значения.

Для того, чтобы выяснить, есть ли оптимум, при какой длине участков гомологии он достигается и можно ли повысить долю рекомбинантов более, чем до 1%, был выполнен следующий эксперимент. Был получен штамм В1415 (MG1655 *lacZ::cat*) путем встраивания гена *cat* в *lacZ*. При встраивании было удалено 42 п.н., соответствующие 14 кодонам. Затем клетки В1415[rDL17] трансформировали фрагментами ДНК, которые были амплифицированы с хромосомы MG1655 и состояли из удаленных 42 п.н. и участков гомологии длиной от 50 до 1000 п.н. (рис. 12). В результате рекомбинации восстанавливается дикая последовательность гена и происходит делеция *cat* длиной в 1011 п.н. На каждую трансформацию брали по 50 нг ДНК вне зависимости от размера фрагмента. Рекомбинантов отбирали на минимальной среде М9 с лактозой (0,4%), а общий титр выживших клеток определяли на той же среде с глюкозой (0,4%).

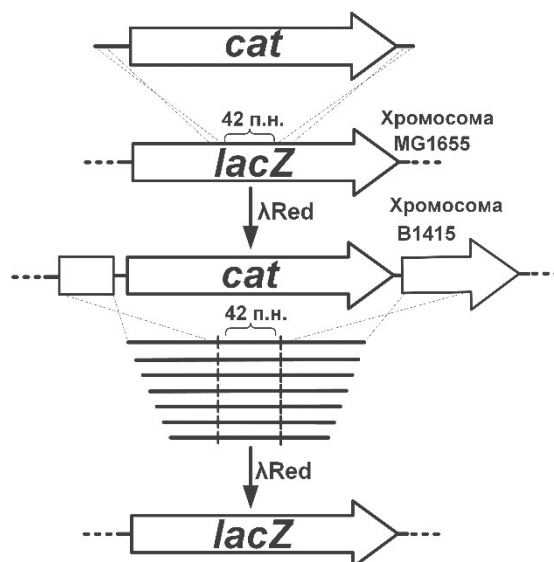


Рисунок 12. Схема эксперимента по оптимизации длины гомологии и общей длины интегративной кассеты.

Как видно из результатов, приведённых на Рисунке 13, зависимость эффективности рекомбинации от длины гомологии действительно имеет куполообразную форму с максимумом в области 350-500 п.н. Увеличение длины с 50 до 350 п.н. приводит к росту доли рекомбинантов в 31 раз, несмотря на падение молярного количества ДНК в 7 раз. При дальнейшем увеличении до 1000 п.н. эффективность рекомбинации падает в $\sim 1,8$ раза. Таким образом, оптимальная длина гомологии составляет 350 п.н. при общей длине интегративной кассеты 742 п.н.

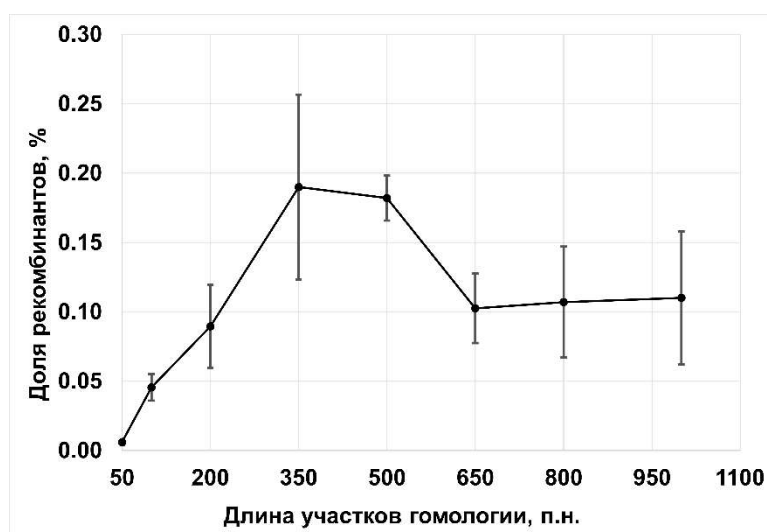


Рисунок 13. Влияние длины участков гомологии на эффективность рекомбинации. Культуру штамма B1415[pDL17] индуцировали L-рамнозой в течение 20 минут, после чего клетки делали электрокомпетентными и

трансформировали 50 нг касет $lacZ^{50}$, $lacZ^{100}$, $lacZ^{200}$, $lacZ^{350}$, $lacZ^{500}$, $lacZ^{650}$, $lacZ^{800}$, $lacZ^{1000}$, имеющих длину гомологии к целевому локусу от 50 до 1000 п.н. Значения представляют собой среднее двух независимых экспериментов, планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

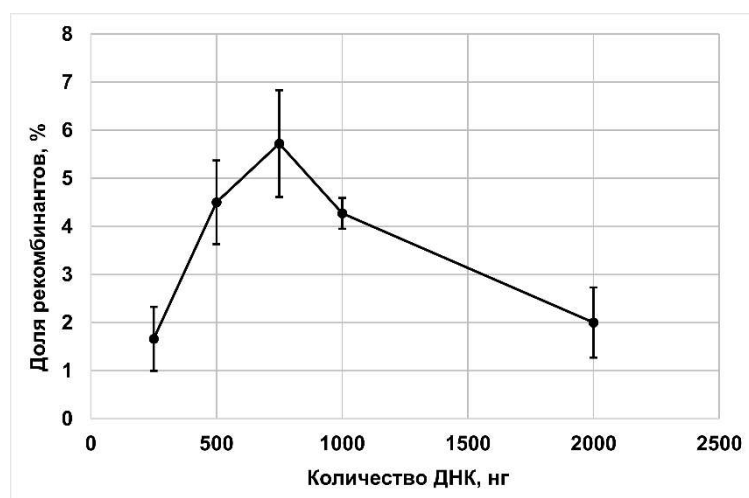


Рисунок 14. Зависимость доли рекомбинантов от количества ДНК. Клетки трансформировали касетой $lacZ^{350}$, количество ДНК изменяли от 250 до 2000 нг. Значения представляют собой среднее двух независимых экспериментов, планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

Полученное максимальное значение доли рекомбинантов 0,19% соответствует 50 нг ДНК на одну трансформацию. С увеличением количества ДНК до 750 нг средняя доля рекомбинантов превысила 5% (рис. 14). Это значение соответствует вероятности успешно отобрать один рекомбинантный клон из 100 случайно выбранных более 99%. Интересно, что вплоть до 750 нг наблюдается практически прямая пропорциональная зависимость между количеством трансформируемой ДНК и долей рекомбинантов. Это означает, что насыщающая концентрация не достигнута. Однако, трансформация большего количества ДНК электропорацией связана с трудностями с получением концентрированного раствора ДНК с низким содержанием ионов, чего проблематично добиться путем переосаждения этанолом или концентрирования раствора на коммерческих колонках для выделения ДНК из агарозного геля.

С использованием оптимизированных условий был проведен сходный эксперимент на примере гена *galK* на штамме В1411. Отличие заключалось в

том, что длина делеции внутри гена составляла 410 п.н. Для того, чтобы значительно не увеличивать общую длину фрагмента, области гомологии были уменьшены до 220 п.н. В результате трансформации 1 мкг этого фрагмента доля рекомбинантов в трех независимых экспериментах варьировала от 2,2% до 4,5%.

Таким образом, в оптимальных условиях эффективность рекомбинации может достигать значений, достаточно высоких для проведения неселективного скрининга. При этом могут быть получены как делеции длиной по крайней мере 1,0 т.п.н., так и небольшие инсерции до 410 п.н. Этот метод может использоваться, как для интеграции промоторов и терминаторов транскрипции, так и для удаления селективных маркеров без применения систем сайт-специфической рекомбинации и маркеров негативной селекции. Во-первых, это позволяет избегать недостатков этих вспомогательных технологий, например, оставшихся после удаления маркера сайтов *lox* или FRT. Во-вторых, интегративные кассеты, которые содержат только один селективный маркер, намного короче по сравнению с кассетами, содержащими два маркера. По этой причине они рекомбинируют более эффективно. Дополнительно, такие интегративные кассеты могут быть получены путем амплификации с любой плазмиды или другой молекулы ДНК, содержащей ген устойчивости к антибиотику, без необходимости конструировать специальные матричные плазмиды, несущие сцепленные маркеры прямой и негативной селекции или маркер прямой селекции, фланкированный сайтами сайт-специфических рекомбиназ.

3.3 Негативная селекция *cl-hok* и интеграции протяжённых конструкций с её помощью

3.3.1 Стратегия негативной селекции

Ключевым элементом подхода, который позволил бы интегрировать протяженные фрагменты гетерологичной ДНК в геном *E. coli* в настоящей

работе был выбран отбор рекомбинантов, потерявших маркер негативной селекции. Для этого маркер должен соответствовать нескольким требованиям. Во-первых, он должен обеспечивать исключительно строгий отбор, в условиях которого выживают только целевые рекомбинанты, тогда как мутанты, спонтанно потерявшие маркер, появляются с пренебрежимо низкой частотой. Во-вторых, стратегия негативной селекции должна быть легко портируемой, чтобы её можно было бы использовать её при работе с любым представляющим интерес штаммом без предварительной модификации его генома. Наконец, стратегия негативной селекции должна быть как можно более надежной и простой, чтобы свести к минимуму оптимизацию условий в различных экспериментах. Чтобы выполнить эти требования, в качестве основы стратегии был выбран ген устойчивости к хлорамфениколу (*cat*) под контролем промотора P_L фага λ , который, в свою очередь, находится под контролем репрессора *CI*. Таким образом, эта транскрипционная единица придает клеткам устойчивость к хлорамфениколу (Sm^R) до тех пор, пока отсутствует функциональный ген *cl*. В противном случае *CI* подавляет транскрипцию *cat*, и клетки остаются чувствительными. В сочетании с модулем P_L -*cat* *cl* служит маркером негативной селекции, который можно легко удалить путем отбора устойчивых к хлорамфениколу клеток. Однако, сначала необходимо привнести модуль P_L -*cat* в немодифицированный штамм. Для этого на основе pDL17 была получена pRed Sm , содержащая P_L -*cat* ниже Red-оперона. В отличие от pDL17, она не содержала *lacI^q*, вследствие чего стабильность её репликации контролировалась диким аллелем *lacI* в хромосоме.

В отношении строгости отбора ген *cl* в совокупности с находящимся в составе автономной плазмиды модулем P_L -*cat* является обычным маркером негативной селекции, который может быть спонтанно инактивирован в результате многочисленных точечных мутаций. Поэтому, для устранения таких мутантов была сконструирована вторая транскрипционная единица, содержащая ген *hok* под контролем промотора P_R , который также, как и P_L ,

репрессирuется *CI*. Этот ген кодирует токсин - компонент системы постсегрегационного лизиса *hok-sok* плазмиды R1 (Gerdes et al., 1986; Thisted et al., 1992), образующий поры в цитоплазматической мембране. Таким образом, в присутствии P_R -*hok* клетки, потерявшие *CI*, погибают в результате дерепрессии *hok*, тогда как клетки, экспрессирующие функциональный репрессор, сохраняют жизнеспособность. Чтобы использовать это свойство для снижения частоты возникновения *cI* мутантов, транскрипционная единица P_R -*hok* была объединена с *cI* и геном устойчивости к канамицину *neo* в составе кассеты *cI-hok-neo* (рис. 15А). После интеграции этой кассеты в хромосому система, состоящая из *cI*, P_R -*hok* и P_L -*cat*, может существовать в соответствии с тремя возможными сценариями (рис. 15Б): 1) стабильное поддержание функциональных генов *cI* и *hok* наряду с репрессией *cat*; 2) Нок-индуцированная гибель мутанта в результате возникновения спонтанной инактивирующей мутации *cI*, вызывающая одновременную дереессию модулей P_L -*cat* и P_R -*hok*; и 3) удаление кассеты *cI-hok* целиком в следствие целенаправленного события рекомбинации, например, интеграции фрагмента ДНК. В последнем случае рекомбинантные клетки сохраняют жизнеспособность и одновременно приобретают устойчивость к хлорамфениколу, что позволяет отобрать их на соответствующей селективной среде.

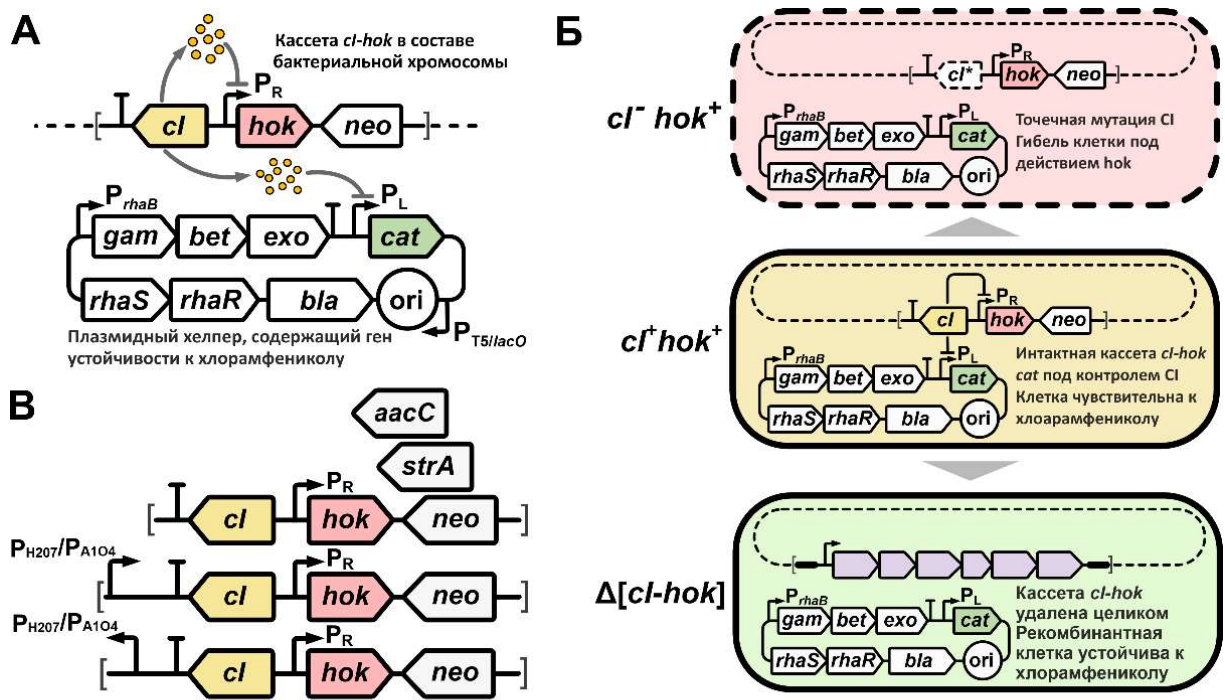
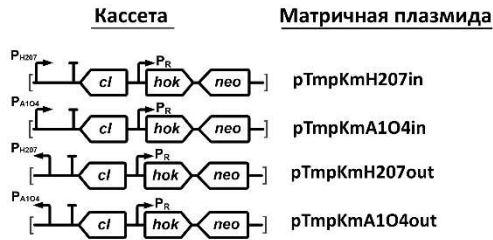


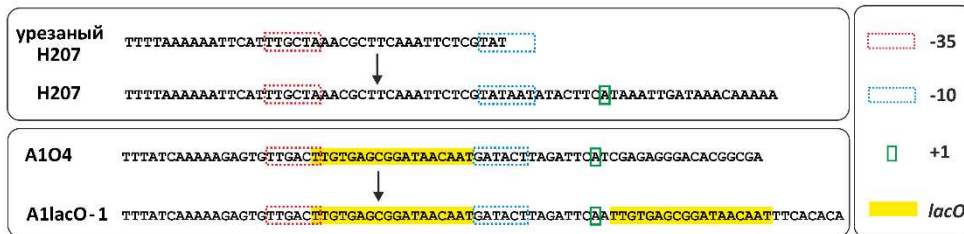
Рисунок 15. Схема стратегии негативной селекции *cl-hok* и вспомогательных генетических конструкций. (А) Иллюстрация механизма негативной селекции *cl-hok*. Кассету *cl-hok-neo* интегрируют в геном клетки с использованием маркера *neo* для прямого отбора рекомбинантов и функций λ Red под контролем *rhaSR-P_{rhaB}*, находящихся на вспомогательной плазмиде pRedCm. В результате интеграции *Cl* репрессирует транскрипционную единицу P_R-hok в составе кассеты и модуль P_L-cat , находящейся на pRedCm, благодаря чему клетка остается жизнеспособной и становится чувствительной к хлорамфениколу. (Б) Три возможных судьбы клетки, несущей кассету *cl-hok* и плазмиду pRedCm. До тех пор, пока экспрессируется функциональный репрессор *Cl*, клетка остается жизнеспособной и чувствительной к хлорамфениколу (средний сценарий). Спонтанная точечная мутация в *cl* приводит к дерепрессии P_L-cat и P_R-hok , последующей *Hok*-опосредованной пермеабиллизации мембраны и гибели мутанта (верхний сценарий). Удаление кассеты *cl-hok* целиком в результате события целенаправленной рекомбинации вызывает дереессию P_L-cat и делает возможным отбор устойчивых к хлорамфениколу рекомбинантов (нижний сценарий). (В) Набор матричных конструкций для амплификации кассет *cl-hok* с маркерами положительной селекции *neo* (канамицин), *strA* (стрептомицин) или *aacC4* (гентамицин), а также промоторами P_{H207} (в укороченной форме) и P_{A104} перед терминатором $T_{L3S1P56}$. Для каждого промотора существуют две альтернативные конструкции, в которых промотор направлен к терминатору или от него.

Область возможного применения стратегии негативной селекции *cI-hok* была расширена путём создания дополнительных интегративных кассет, в которых ген устойчивости к канамицину был заменен маркерами, придающими устойчивость к гентамицину - *aacC4* и стрептомицину - *strA* (рис. 15В). Также были получены четыре кассеты, содержащие сильный конститутивный промотор фага T5 P_{H207} или LacI-репресслируемый синтетический промотор P_{A104} (Deuschle et al., 1986; Lanzer et al., 1988) (рис. 15В, рис. 16А-В). В этих конструкциях каждый из промоторов направлен либо от модуля *cI-hok*, либо к нему. Кассеты первого типа предназначены для интеграции перед хромосомными генами, заменяя тем самым их нативные промоторы. Кассеты второго типа, будучи интегрированными в хромосому, могут быть заменены представляющей интерес конструкцией без промотора посредством λ Red-рекомбинации и негативной селекции *cI-hok*. В результате этой манипуляции конструкция попадает под контроль P_{H207} или P_{A104} (рис. 16Г). Таким образом, кассеты *cI-hok* могут служить для оверэкспрессии как собственных, так и гетерологичных генов в составе хромосомы, что позволяет использовать данный подход в том числе для задач метаболической инженерии.

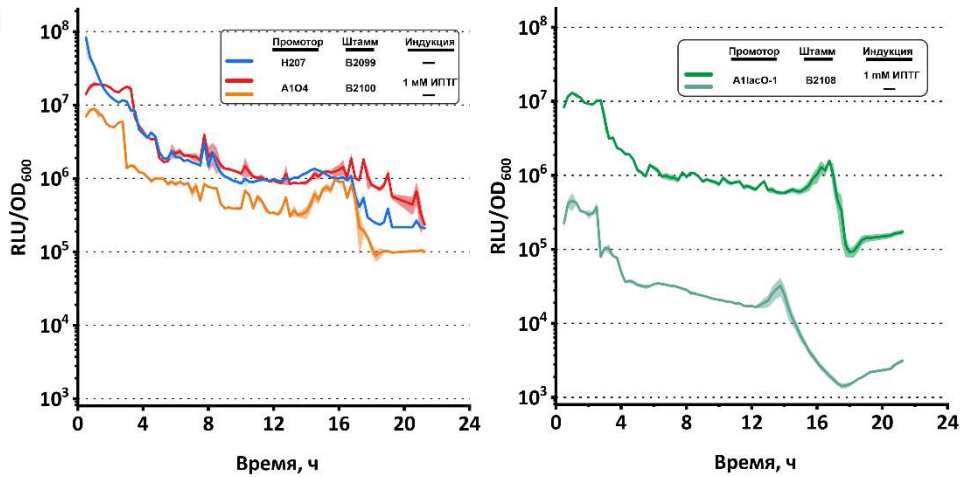
А



Б



В



Г

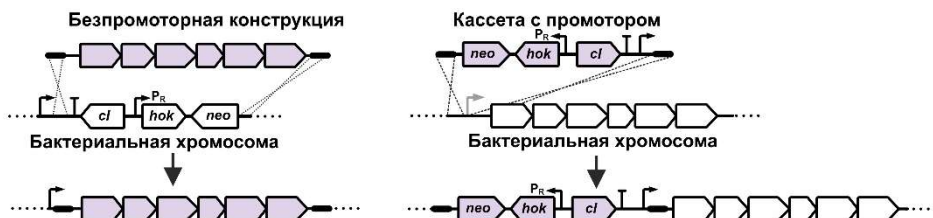


Рисунок 16. Кассеты *cl-hok*, сцепленные с промоторами P_{H207} и P_{A104} . (А) Набор матричных конструкций. Для каждого промотора существуют две альтернативные плазмиды, в которых промотор направлен к или от терминатора $T_{L3S1P56}$. (Б) Последовательность промоторов P_{H207} (верхняя панель) и P_{A104} (нижняя панель) в составе матричных плазмид. P_{H207} клонирован в укороченной форме, лишенной последних трех нуклеотидов гексамера -10 и сайта начала транскрипции, которые можно восстановить, добавив их к праймеру в ПЦР. Хотя P_{A104} подвержен репрессии *LacI*, уровень репрессии мал в штамме дикого типа. Измеренное с использованием *lux*-репортёра соотношение его активностей при росте на среде с и без IPTG составляет от 2-х до 5-ти (рис. 16В, левая панель). Однако P_{A104} может быть легко преобразован в $P_{A1lacO-1}$ путем добавления второго *lac*-оператора при амплификации кассеты. Этот промотор демонстрирует 20–60-кратную

репрессию в штамме дикого типа (рис. 16В, правая панель) и, приблизительно, тысячекратную репрессию при повышенном уровне синтеза LacI (рис. 21А). (В) Люминисценция клеток штаммов, содержащих фьюжны промоторов P_{H207} , P_{A104} и $P_{A1lacO-1}$ с опероном *luxCDABE*. Представленные данные показывают временную динамику люминисценции, нормированной на значения OD_{600} , соответствующую фазам роста от ранней логарифмической (OD_{600} 0,05–0,1) до поздней стационарной (OD_{600} 1,7–1,9). Ранние временные точки, соответствующие OD_{600} менее 0,05, не показаны. Измерение проводили, как описано в разделе 2.16 «Измерение роста клеток и *in vivo* люминисценции». Посевную культуру растили в течение ночи без индукции. После разведения в свежей LB (нулевая временная точка представленного эксперимента) в культуру вносили 1 мМ IPTG для индукции промоторов P_{A104} и $P_{A1lacO-1}$. Данные представляют собой среднее значение 6 технических повторностей (6 лунок, инокулированных одной и той же ночной культурой), затемненные области обозначают стандартное отклонение. (Г) Два сценария применения кассет с промоторами. Кассету с промотором, направленным к терминатору $T_{L3S1P56}$, сначала встраивают в бактериальную хромосому. Затем её можно заменить безпромоторной конструкцией (обозначена фиолетовым цветом), в результате чего она будет помещена под контроль гетерологичного промотора. Кассеты с промотором в обратной ориентации можно использовать непосредственно для замены нативных промоторов.

3.3.2 Оценка эффективности негативной селекции *cl-hok*

Прежде всего, для того, чтобы оценить эффективность негативной селекции *cl-hok*, были определены наиболее строгие условия отбора, то есть максимальная концентрация хлорамфеникола в LB, при которой клетки MG1655[pRedCm] (P_L -*cat* в этом штамме полностью дерепрессирован) способны нормально расти. Эксперимент показал, что при высеве ночной культуры на чашки с LB содержащей менее 200 мг/л хлорамфеникола титр клеток не отличается от измеренного на чашках со средой LB с ампициллином (pRedCm содержит также маркер устойчивости к ампициллину *bla*), тогда как при превышении 200 мг/л, титр жизнеспособных клеток снижался. По результатам этого эксперимента, концентрация 200 мг/л была выбрана в качестве порогового значения и использована в дальнейшей работе.

Основным недостатком существующий маркеров негативной селекции является высокая частота спонтанных мутантов, которые выживают в селективных условиях. Чтобы оценить эффективность новой стратегии и

устойчивость конструкций *cI-hok* к возникновению спонтанных мутантов, способных расти в присутствии хлорамфеникола, была измерена скорость возникновения таких мутаций. Для сравнения были использованы два наиболее часто широко используемых маркера - *sacB* (Murphy et al., 2000; Ellis et al., 2001) и *rpsL* (Bird et al., 2011). Интегративные кассеты, содержащие *cI-hok*, *sacB* или *rpsL*, были параллельно интегрированы в локусы *galETKM*, *lacZYA* и *araBAD* (рис. 17А), после чего были измерены скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать на среде с хлорамфениколом (*cI-hok*), сахарозой (*sacB*) и стрептомицином (*rpsL*). Кассета *cI-hok* в сочетании с модулем P_L -*cat* на pRedCm демонстрировала значения от 4×10^{-10} до 9×10^{-10} мутаций на поколение (рис. 17Б) в зависимости от геномного локуса, в который была интегрирована кассета. Сравнение с *sacB* и *rpsL*, интегрированными в те же локусы, показало, что значения для маркера *cI-hok* были в 320–790 раз ниже по сравнению с соответствующими значениями *sacB* и в 220–570 раз ниже по сравнению с таковыми для *rpsL*.

Чтобы подтвердить, что транскрипционная единица P_R -*hok* действительно является ключевым элементом, благодаря которому эффективность стратегии *cI-hok* на несколько порядков превышает таковую для *sacB* и *rpsL*, была получена кассета *cI-hok*^{L13ochre}-*neo*, в которой *hok* инактивирован путём замены 13-ого кодона на стоп-кодон. Эта кассета была интегрирована в локус *lac*. Измерение показало, что инактивация *hok* приводит к 360-кратному увеличению скорости возникновения спонтанных мутаций, придающих клеткам устойчивость к хлорамфениколу, по сравнению с кассетой, содержащей функциональный *hok* (рис. 17В). Этот результат свидетельствует о том, что, как и ожидалось, модуль P_R -*hok* эффективно устраняет большинство спонтанных мутантов, потерявших функциональный *cI*.

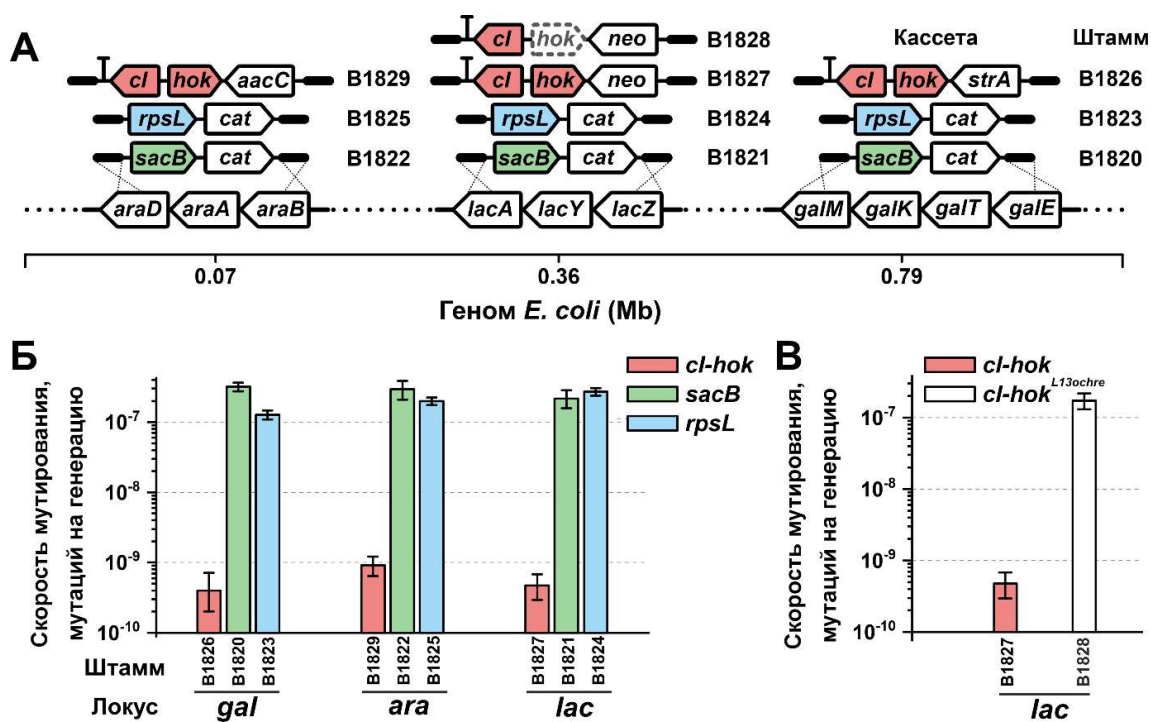


Рисунок 17. Оценка эффективности негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема конструирования штаммов, использованных для измерения скорости возникновения спонтанных мутаций, придающих устойчивость в условиях негативной селекции. Каждый из оперонов *galETKM*, *lacZYA* и *araBAD* был инактивирован в штамме MG1655 с помощью кассет *cl-hok*, *cat-rpsL* или *cat-sacB* с использованием одних и тех же плеч гомологии для каждого локуса. Кассеты *cat-rpsL* встраивали в хромосому B1733 (MG1655 *rpsL*^{K43R}). Оперон *lacZYA* был дополнительно инактивирован с использованием кассеты *cl-hok^{L13ochre}-neo* с неактивным *hok*. (Б) Скорость возникновения мутаций, придающих устойчивость в условиях негативной селекции, для маркеров *cl-hok*, *sacB* и *rpsL*. Штаммы, несущие кассеты *cl-hok*, были трансформированы pRedCm, чтобы обеспечить возможность негативной селекции. Мутантов отбирали на чашках LB с хлорамфениколом (200 мг/л), LB со стрептомицином (500 мг/л) и SuLB для штаммов с кассетами *cl-hok*, *rpsL* и *sacB*, соответственно. Значения (число мутаций, позволяющих выживать в условиях негативной селекции на поколение), были рассчитаны на основе флуктуационного анализа (частоты мутантов показаны на Рисунке 18) с использованием метода максимального правдоподобия Ма-Сандри-Саркара и программного обеспечения FluCalc как описано в разделе 2.14 «Измерение скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать в условия негативной селекции». Планки погрешностей указывают 95% доверительные интервалы, рассчитанные с использованием того же программного обеспечения. В экспериментах с B1826 [pRedCm] часть культур не содержала Cm^R мутантов. Поэтому скорости мутирования и 95% доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода *p0*, как описано в (Foster, 2006). (В) Сравнение скоростей мутирования кассет *cl-hok* и *cl-hok^{L13ochre}* в локусе *lac*. Все измерения и расчеты были выполнены, как описано для Рисунка 17Б.

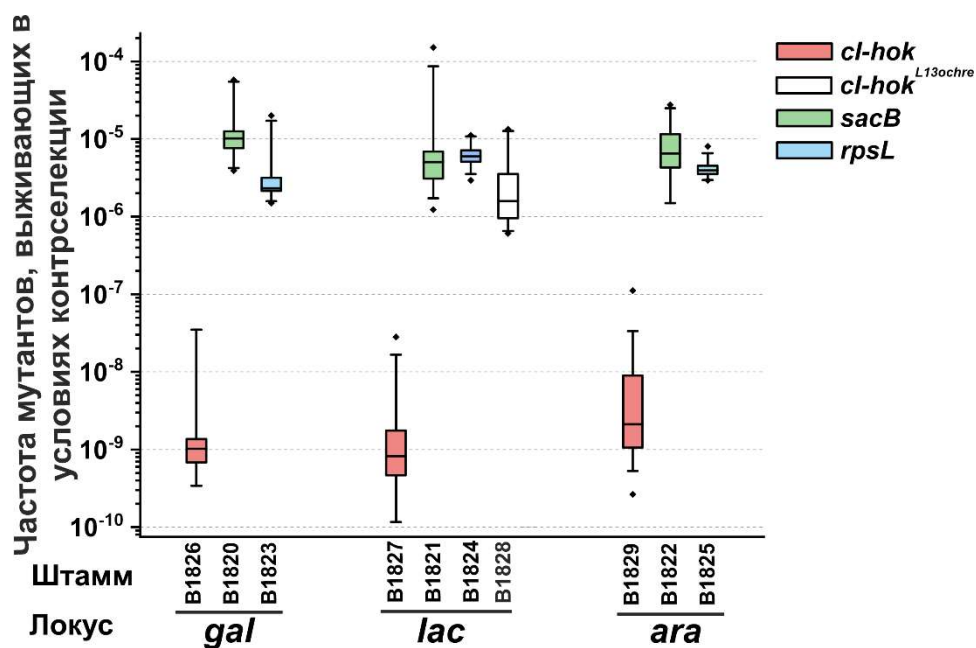


Рисунок 18. Частота возникновения мутантов, выживающих в условиях негативной селекции для маркеров *cl-hok*, *cl-hok*^{L13UAA}, *sacB* и *rpsL*. Штаммы с кассетами *cl-hok* содержали плазмиду pRedCm. Для каждого штамма 20 независимых ночных культур высевали на соответствующие селективные чашки (LB с хлорамфениколом 200 мг/л, SuLB и LB со стрептомицином 500 мг/л). Три культуры каждого штамма разбавляли в 10⁶ раз и высевали на неселективную среду LB для определения общего титра жизнеспособных клеток. Частоту рассчитывали путем деления измеренного титра мутантов на средний титр жизнеспособных клеток. Данные представлены в виде диаграммы «ящик с усами», где верхняя и нижняя границы ячейки представляют собой первый и третий квартиль; горизонтальная линия внутри прямоугольника является медианой; планки погрешностей указывают на квантили 5% и 95%; точки вне планок являются выбросами.

3.3.3 Подавление активности эндонуклеазы EсоKI облегчает интеграцию конструкций, синтезированных с помощью ПЦР

Для того, чтобы оценить возможность применения негативной селекции *cl-hok* для привнесения гетерологичных конструкций в геном, была измерена эффективность λRed-зависимой интеграции протяженных фрагментов ДНК без селективных маркеров путём замены кассеты *cl-hok* и отбора устойчивых к хлорамфениколу рекомбинантов. С этой целью были выбраны опероны *scrKYABR* и *luxCDABE* из *Photorhabdus luminescens*. Оба фрагмента были синтезированы в ПЦР и были фланкированы участками гомологии длиной 80

п.н. к локусам *gal (scrKYABR)* или *ara (luxCDABE)*. В экспериментах с кассетой *gal::scrKYABR* и штаммом B1826[pRedCm], содержащем конструкцию *cI-hok-strA* в локусе *gal*, посредством *cI-hok* негативной селекции были отобраны целевые рекомбинанты, однако их частота среди спонтанных Cm^R мутантов составляла не более 1–3%, в то время как в нескольких экспериментах по замене маркера *cI-hok* в локусе *ara* кассетой *ara::luxCDABE* были получены значения более 60%. Это было особенно неожиданно, поскольку эффективность негативной селекции *cI-hok* в локусе *ara* была самой низкой среди трех протестированных (рис. 17Б). Анализ последовательности кассет показал, что *scrKYABR* содержит три сайта узнавания эндонуклеазы EcoKI, тогда как *luxCDABE* не содержит ни одного. Таким образом, расхождение результатов для кассет *gal::scrKYABR* и *ara::luxCDABE* могло быть вызвано деградацией фрагмента *gal::scrKYABR*, чувствительного к действию EcoKI, так как составляющая его ДНК не была метилирована. Учитывая относительно высокую частоту сайтов узнавания EcoKI (один на каждые 8 т.п.н.), эта эндонуклеаза может значительно снижать эффективность манипуляций с геномом с использованием фрагментов ДНК, синтезированных с помощью ПЦР. Очевидное решение – инактивация гена *hsdR*, кодирующего эндонуклеазу EcoKI. Однако, такая стратегия неудобна в использовании, если предполагается работать с несколькими различными штаммами. В этом случае мутацию *hsdR* придётся вносить в каждый из них. Более изящным решением было бы подавление активности EcoKI *in trans*. С этой целью были протестированы несколько антирестрикционных функций, которые экспрессируют некоторые бактериофаги и конъюгативные плазмиды для супрессии систем рестрикции-модификации при внедрении в клетки нового штамма-хозяина. В частности, были выбраны Ral фага λ, ArdA плазмиды ColIb-P9 и Ocr фага T7. Последние два белка ингибируют EcoKI в результате того, что они сходны по своей структуре с ДНК и напрямую связываются с эндонуклеазой (Walkinshaw et al., 2002; McMahon et al., 2009), тогда как Ral

действует, стимулируя активность метилтрансферазы EcoKI в отношении ДНК, неметилизованной по обеим цепям (Loenen et al., 1986).

Гены, кодирующие указанные белки, были клонированы на pRedCm перед *gam* так, что *ral*, *ardA*, *ocr* и Red экспрессировались как единый искусственный оперон под контролем P_{rhaB} (рис. 19А). Эффективность полученных конструкций и pRedCm в качестве контроля была измерена в штамме MG1655 путём его трансформации чувствительной к действию EcoKI кассетой *gal::scrKYABR*. Электропорация клеток, экспрессирующих только гены λ Red, дала лишь несколько рекомбинантов (рис. 19Б). Совместная экспрессия Ral практически не влияла на эффективность рекомбинации, тогда как ArdA и, в большей степени, Ocr приводили к резкому увеличению частоты Scr^+ рекомбинантов. В частности, коэкспрессия Ocr и Red стимулировала эффективность рекомбинации более чем на три порядка. Следующий эксперимент был проведён с тем, чтобы выяснить было ли подавление активности эндонуклеазы EcoKI полным, т. е. была ли достигнута максимально возможная эффективность рекомбинации. Для этого была измерена эффективность высева неметилизованного фага $\lambda.0$ (рис. 19В). В этом эксперименте дефектный по *hsdMS* штамм TG1 и дикий штамм MG1655 выступали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Было обнаружено, что рост эффективности высева $\lambda.0$ на газоне клеткок, экспрессирующих Ral, ArdA и Ocr, сходен с тенденцией эффективности рекомбинации в этих клетках, тогда как эффективность высева метилизованного λ оставалась неизменной. Эти результаты указывают на то, что активность эндонуклеазы EcoKI была единственным препятствием для интеграции *gal::scrKYABR* в хромосому. Учитывая, что совместная экспрессия Ocr вместе с Red полностью устраняет влияние EcoKI на рост $\lambda.0$, был сделан вывод, что эффективность рекомбинации в клетках, экспрессирующих *ocr*, достигла плато.

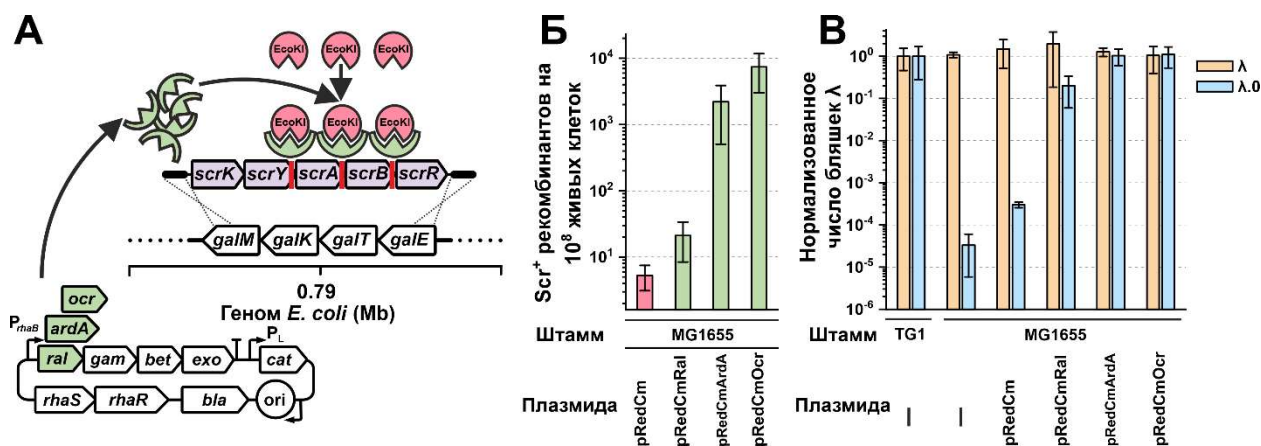


Рисунок 19. Увеличение эффективности интеграции в результате подавления активности эндонуклеазы EcoKI. (А) Схема эксперимента по оценке способности антирестрикторных функций повышать эффективность рекомбинации. Гены *ral*, *ardA* или *ocr* клонировали на pRedCm перед *gam*. Полученные плазмиды трансформировали в MG1655 и тестировали в экспериментах по замене оперона *galETKM* на кассету *scrKYABR*, включающую три сайта узнавания EcoKI (показаны красными прямоугольниками). (Б) Эффективность замены оперона *galETKM* кассетой *scrKYABR*. Клетки MG1655, несущие pRedCm, pRedCmRal, pRedCmArdA или pRedCmOcr, индуцировали для экспрессии λRed и антирестрикторных функций и трансформировали 0,6 мкг фрагмента *scrKYABR*. Scr⁺ рекомбинантов отбирали на чашках M9 с 0,5% сахарозы, а титр жизнеспособных клеток определяли на неселективных чашках со средой LB. Показанные значения являются средними из трех биологических повторностей; планки погрешностей обозначают SD. (В) Влияние антирестрикторных функций на эффективность высева фага λ и неметилированного фага λ.0. Подробное описание представлено в разделе 2.15 «Исследование эффективности высева фага λ». Оба фага высевали на клетки, в которых была предварительно индуцирована экспрессия λRed и антирестрикторных функций, а также на клетки бесплазмидных штаммов MG1655 и TG1. Нормализованную эффективность высева для каждого штамма рассчитывали путем деления измеренного титра фага на титр того же фага на газоне TG1. Затем рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение с использованием нормализованной эффективности высева. Для TG1 нормализованное стандартное отклонение рассчитывали путем деления ненормализованного стандартного отклонения на ненормализованное среднее значение. Показанные значения являются средними для трех биологических повторностей; планки погрешностей обозначают SD.

3.3.4 Анализ спонтанных мутаций, позволяющих выживать в условиях негативной селекции *cI-hok*

Дизайн стратегии негативной селекции *cI-hok* подразумевает, что клетка, несущая кассету *cI-hok* и модуль P_{L-cat} , неспособна приобрести устойчивость к хлорамфениколу в результате одиночной замены. Тем не менее, штаммы B1826[pRedCm], B1827[pRedCm] и B1829[pRedCm] с небольшой частотой выщепляют Cm^R мутантов (рис. 18). С тем, чтобы выявить природу таких мутаций, из культуры каждого из этих штаммов были выделены по 32 независимых спонтанных мутанта. Исследование структуры локусов *gal*, *lac* и *ara* с помощью ПЦР с праймерами, которые отжигаются выше и ниже кассеты *cI-hok* (рис. 20А), показало, что продуктом ПЦР с хромосомы некоторых мутантов был фрагмент ДНК, заметно более короткий, чем фрагмент, соответствующий интактной кассете *cI-hok*. В то же время ПЦР с других мутантов вообще не давала продукта (рис. 20Б). Это свидетельствовало о том, что мутанты потеряли некоторую последовательность между сайтами отжига праймеров, либо потеряли один или оба сайта, что, в свою очередь, говорит о том, что в исследуемых локусах произошли спонтанные делеции, захватывающие кассету. Чтобы подтвердить это предположение, мутантов протестировали на устойчивость к соответствующим антибиотикам (стрептомицину, канамицину или гентамицину). Большинство мутантов, которые, как предполагалось из результатов ПЦР, несут делеции, также были чувствительны к антибиотику (Рис 20Б, левая панель). Таких мутантов среди 32 протестированных в *gal*-, *lac*- и *ara*-группе было по 15, 9 и 14 соответственно. Два мутанта, один в *ara*-группе и один в *lac*-группе, дали заметно более короткий продукт ПЦР, чем ожидалось, но сохранили устойчивость. По-видимому, в этих клонах делеция затронула *cI* и *hok*, но не маркер прямой селекции.

Чтобы дополнительно подтвердить, что часть спонтанных мутантов возникает в результате делеций, был протестирован фенотип геномных локусов, сцепленных с сайтом интеграции кассеты *cI-hok*. Так, локус *gal*

сцеплен с геном *pgl*, а локусы *lac* и *ara* сцеплены с оперонами *prpBCDE* и *leuABCD*, соответственно (рис. 20В). Инактивация *pgl* ведёт к потере активности 6-фосфоглюконолактоназы и появлению Blu-фенотипа (Thomason et al., 2004), проявляющегося как темно-синее окрашивание клеток, растущих на минимальной среде с мальтозой, развивающееся под действием паров йода (рис. 20Г). Опероны *leuABCD* и *prpBCDE* контролируют биосинтез лейцина и способность к утилизации пропионата. Учитывая отсутствие «essential» генов в промежутках между локусами для каждой из пар *gal-pgl*, *lac-prp* и *ara-leu*, можно ожидать, что некоторые отобранные мутанты могут потерять сцепленный участок хромосомы вместе с кассетой *cl-hok*. Действительно, четыре мутанта из 15-ти потерявших устойчивость к стрептомицину в группе *gal* проявляли Blu-фенотип (рис. 20Б, правая панель). ПЦР-анализ этих мутантов также свидетельствовал об изменении структуры в локусе *gal*. Это согласуется с гипотезой о том, что эти мутанты возникли в результате делеции, охватывающей всю область между *cl-hok* и *pgl*. Таким же образом были протестированы мутанты из *lac*- и *ara*-группы. Анализ показал, что четыре чувствительных к канамицину мутанта из первой группы неспособны расти на пропионате как единственном источнике углерода, а три чувствительных к гентамицину мутанта из второй группы являются ауксотрофами по лейцину. Это указывает на то, что делеции у этих мутантов простираются от кассеты *cl-hok* до *prpBCDE* и *leuABCD* соответственно.

Мутанты, сохранившие интактную кассету *cl-hok*, могли вновь приобрести устойчивость к хлорамфениколу в результате мутаций, затрагивающих *pRedCm*. Чтобы проверить эту гипотезу, плазмидную ДНК из двенадцати спонтанных мутантов (по четыре мутанта, сохранивших кассету *cl-hok* и маркер прямой селекции из каждой группы) перетрансформировали в штамм B1826. Все плазмиды, кроме одной, давали колонии, устойчивые как к хлорамфениколу, так и к ампициллину, что указывает на то, что устойчивость исходных мутантов к хлорамфениколу была обусловлена мутацией плазмиды. Рестрикционный анализ и секвенирование показали, что 10 из 11 оставшихся

плазмид возникли в результате дупликации *cat*, в результате которой вторая копия оказывалась непосредственно за промотором P_{T5/lacO} (рис. 20Д и Е). У этих мутантов *cat*, по-видимому, экспрессируется по причине того, что P_{T5/lacO} обладает ненулевой базальной активностью на фоне дикого аллеля *lacI*. Два оставшихся мутанта были отнесены к минорному классу и далее не анализировались.

В совокупности, эти результаты указывают на то, что существует два основных возможных пути выживания в условиях негативной селекции *cl-hok*. Во-первых, клетка может потерять кассету *cl-hok* в результате спонтанной делеции, охватывающей либо часть кассеты, либо всю кассету вместе с прилегающими областями хромосомы. Второй класс мутаций представляет собой тандемную дупликацию *cat*, в результате которой возникает вторая копия, не поддающаяся CI-репрессии.

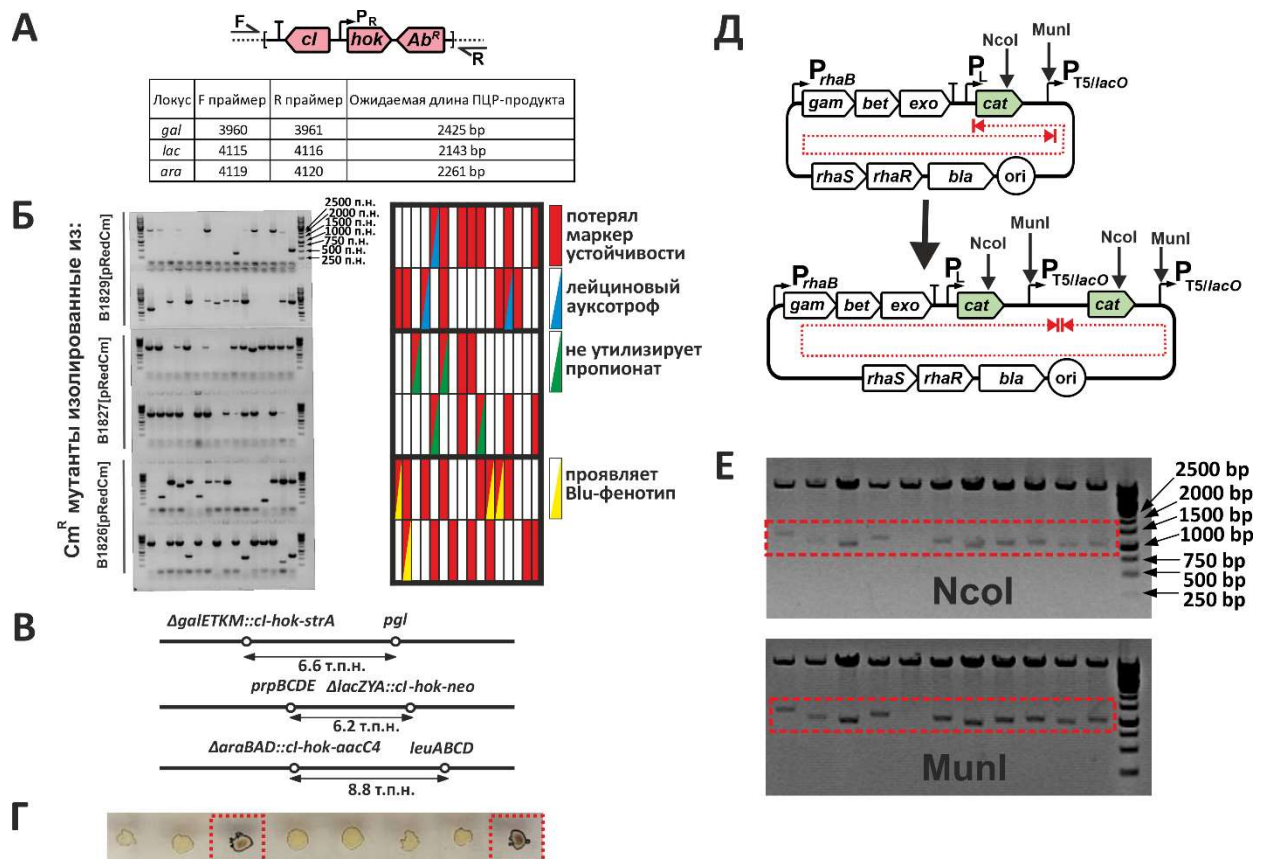


Рисунок 20. Анализ спонтанных мутантов, выживающих в условиях негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема эксперимента по изучению структуры геномных локусов с интегрированной кассетой *cl-hok*. Пунктирная линия обозначает бактериальную хромосому, а сплошная линия соответствует кассете *cl-hok*; Ab^R – гены *neo*, *strA* или *aacC4*; F и R – прямой и обратный

праймеры. Пары праймеров, использованные для анализа каждого геномного локуса, и ожидаемая длина (для интактной кассеты *cl-hok*) продуктов ПЦР указаны в таблице под схемой. (Б) Анализ спонтанных Sm^R мутантов с помощью локус-специфической ПЦР (левая панель) и фенотипического исследования (правая панель). 96 мутантов, выделенных из культур штаммов B1826[pRedCm], B1827[pRedCm] или B1829[pRedCm], исследовали методом ПЦР с колоний с использованием пар праймеров, указанных на Рисунке 20А. В таблице на левой панели показаны фенотипы тех же клонов в порядке, соответствующем порядку на электрофореграмме. Наличие маркера Ab^R исследовали тестом на LB с добавлением соответствующего антибиотика. Лейциновые ауксотрофы не росли на среде M9 с глюкозой, но росли при добавлении 50 мг/л L-лейцина; *prp*-мутанты не были способны расти на среде M9 с 0,5% пропионата натрия, но росли на среде M9 с глюкозой. Blu-фенотип *pgl*-мутантов исследовали, как описано ранее (Thomason et al., 2004). (В) Карта сцепления локусов, прилегающих к точке интеграции кассеты *cl-hok*. (Г) Blu-фенотип (3-е и 8-е пятна), обусловленный мутацией *pgl*. (Д) Схема перестройки pRedCm, которая приводит к дупликации *cat*. Красная пунктирная линия указывает на возможный сценарий перестройки. Примечательно, что среди 10 мутантных плазмид было обнаружено 8 уникальных точек соединения (обозначенных двумя красными стрелками на нижней схеме) между *cat* и $P_{T5/lacO}$. Один тип соединения был обнаружен у трех независимо выделенных мутантов. Сайты узнавания *MunI* и *NcoI* в пределах $P_{T5/lacO}$ и *cat* уникальны в случае pRedCm. Эти сайты дублируются в 10 из 11 проанализированных мутантных плазмид, как показано на Рисунке 20Е. (Е) Электрофореграмма мутантных плазмид, обработанных эндонуклеазами *MunI* и *NcoI*. Второй фрагмент длиной около 1 т.п.н. (отмечен красной рамкой) свидетельствует о дупликации соответствующих сайтов.

Появление мутантов последнего типа свидетельствует о том, что всё еще существует возможность дальнейшего снижения частоты мутаций и повышения эффективности негативной селекции. Интересно, что мутантные плазмиды напоминают продукт неправильного замыкания линейной мультимерной формы плазмиды, которая, как известно, образуется при репликации плазмид с ориджином *ColE1* в клетках, экспрессирующих гены λ Red (Silberstein et al., 1990; Mythili et al., 1993). Это говорит о том, что высокая копияность pRedCm является основным недостатком. Во-первых, по-видимому, P_{rhaB} , находясь на многокопийной плазмиде, даже в отсутствие индукции обладает небольшим уровнем базальной активности, которого всё же достаточно для того, чтобы вызывать образование таких мультимеров и,

следовательно, образование дефектных плазмид, в которых *cat* больше не репрессируется *CI*. Во-вторых, частота возникновения мутантных молекул пропорциональна числу копий плазмиды, поскольку каждая из копий может быть подвергнута мутации. Чтобы уменьшить как количество копий, так и уровень базальной экспрессии λ Red, весь вспомогательный модуль *ocr- γ bexh-P_L-cat* был перенесён в хромосому. Чтобы добиться надёжной репрессии и удобной индукции оперона *ocr- γ bexh*, была сконструирована кассета, состоящая из сильного гибридного промотора P_{AllacO-1} (Lutz et al., 1997), репрессируемого LacI, и гена *lacI* под контролем промотора P_{H207} фага T5, благодаря которому достигается сверхсинтез репрессора. Уровень активности *lux*-репортёра под контролем такой кассеты в отсутствие индукции превышал фоновые значения люминисценции в не более, чем в 30-40 раз, тогда как при добавлении в среду IPTG активность возрастала в 10²-10³ раз в зависимости от фазы роста (рис. 21А). Конструкция *ocr- γ bexh-P_L-cat* была интегрирована между P_{AllacO-1} и *luxC*, в результате чего был получен штамм B2137 (рис. 21Б). Предельная концентрация хлорамфеникола для B2137, при которой он был способен расти в отсутствие репрессии P_L-*cat*, составила 25 мг/л.

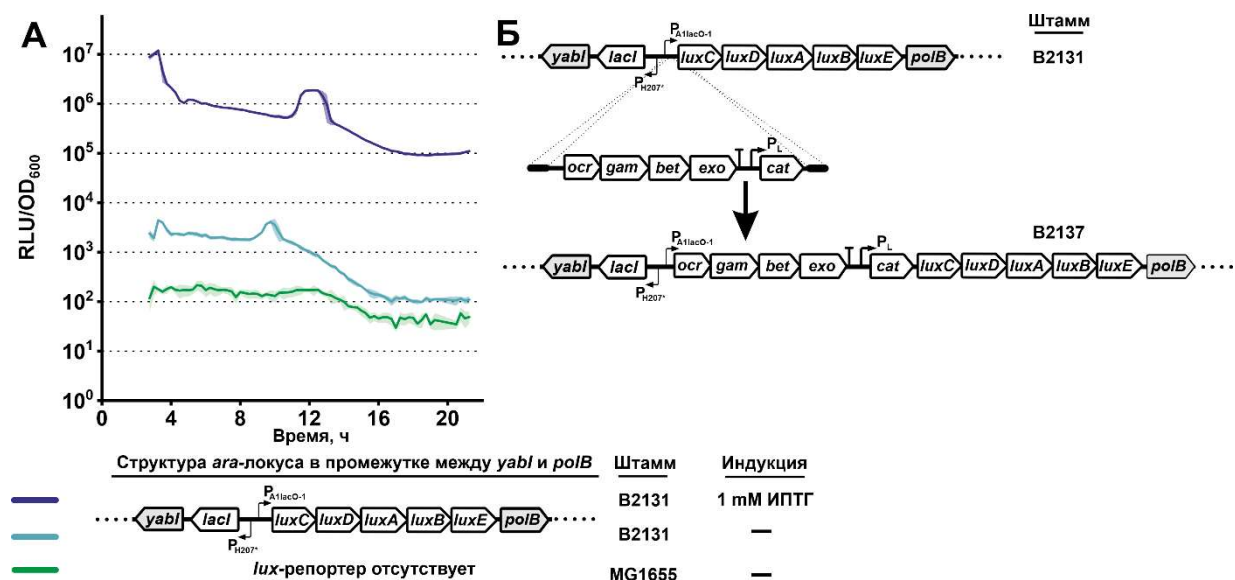


Рисунок 21. Интеграция вспомогательного модуля *ocr- γ bexh-P_L-cat* в бактериальную хромосому под контролем кассеты P_{H207}-*lacI*-P_{AllacO-1}. (А) Измерение степени репрессии промотора P_{AllacO-1} в кассете P_{H207}-*lacI*-P_{AllacO-1} с использованием оперона *luxCDABE* в качестве репортёра. Представленные данные показывают люминисценцию, нормированную на OD₆₀₀. Показанный

временной отрезок соответствует фазам роста от ранней логарифмической (OD600 0,1–0,2) до поздней стационарной (OD600 1,7–1,9). Ранние временные точки, соответствующие OD600 менее 0,1, не показаны. Измерение проводили, как описано в разделе 2.16 «Измерение роста клеток и *in vivo* люминесценции». Посевную культуру растили в течение ночи без индукции. После разведения в свежей LB (в нулевую временную точку представленной кривой) вносили IPTG до конечной концентрации 1 мМ для индукции промотора P_{A1lacO-1}. Нелюминесцентный штамм MG1655 служил индикатором фоновой люминесценции. Данные представляют собой среднее значение 6 технических повторностей (6 лунок, инокулированных из одной ночной культуры), затемненные области обозначают стандартное отклонение. (В) Схема хромосомной интеграции модуля *ocr-γβexo-P_L-cat* под контролем кассеты P_{H207-lacI}-P_{A1lacO-1}. Полученный штамм был назван B2137. Нативные хромосомные области и синтетические конструкции обозначены серым и белым цветом, соответственно.

Для того, чтобы оценить эффективность негативной селекции *cl-hok* в клетках с хромосомным вспомогательным модулем, в штамм B2137 параллельно были перенесены мутации $\Delta galETKM::cl-hok-strA$ и $\Delta lacZYA::cl-hok-neo$, в результате были получены штаммы B2140 и B2141 соответственно. В этих штаммах измерили скорость возникновения мутаций, придающих клеткам устойчивость к хлорамфениколу. В экспериментах со штаммом B2140 не удалось выделить ни одного мутанта среди 20 независимых культур, каждая из которых содержала по $3,4 \times 10^9$ клеток. Значение для B2141 составило $9,9 \times 10^{-11}$ мутаций на поколение (95% доверительный интервал $3,5 \times 10^{-11}$ – $2,2 \times 10^{-10}$), что примерно в четыре раза ниже, чем у изогенного штамма B1827, несущего pRedCm. Анализ 16 независимо полученных мутантов показал, что 15 потеряли устойчивость к канамицину, из которых 13 не могли расти на пропионате, что указывало на нарушение функции оперона *prpBCDE*, расположенного на расстоянии 6 т.п.н. от кассеты. Из этих результатов следует вывод, что при использовании хромосомной вспомогательной конструкции большая часть спонтанных мутантов возникают в результате внутрихромосомных делеций кассеты *cl-hok*. Такие делеции являются неотъемлемым свойством генетического аппарата *E. coli*. Поэтому частотой их возникновения навряд ли можно легко манипулировать без обширной

модификации механизмов репликации и рекомбинации (Uematsu et al., 1999; Mashimo et al., 2004). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что хромосомный вспомогательный модуль позволяет достичь предельно возможной эффективности негативной селекции.

3.3.5 Интеграция гетерологичных конструкций в бактериальную хромосому при помощи негативной селекции *cI-hok*

Целью разработки новой стратегии негативной селекции было, в первую очередь, её использование в качестве инструмента для интеграции в геном конструкций, не содержащих селективного маркера. Для того, чтобы проверить возможность таких генетических манипуляций, в работе были использованы интегративные кассеты, несущие в своём составе опероны *scrKYABR*, *vioABCDE* и *luxCDABE*. Интеграция перечисленных конструкций в геном и их последующая экспрессия приводит к развитию легко различимого фенотипа, позволяющего отличать рекомбинантов от спонтанных мутантов. Так, клетки, содержащие *scrKYABR*, способны утилизировать сахарозу, что легко обнаружить с использованием тетразолиевого агара или среды МакКонки. Оперон *luxCDABE* контролирует способность к люминисценции. Люминисцирующие колонии можно различить визуально в темноте, либо с использованием фотографий, сделанных с продолжительной выдержкой. Экспрессия *vioABCDE* приводит к развитию тёмно-синей окраски колоний в результате накопления виолацеина (рис. 22). Перечисленные кассеты интегрировали в локусы *gal*, *lac*, *tan* и *ara*, каждый из которых был предварительно маркирован кассетой *cI-hok* (рис. 23А и Б).

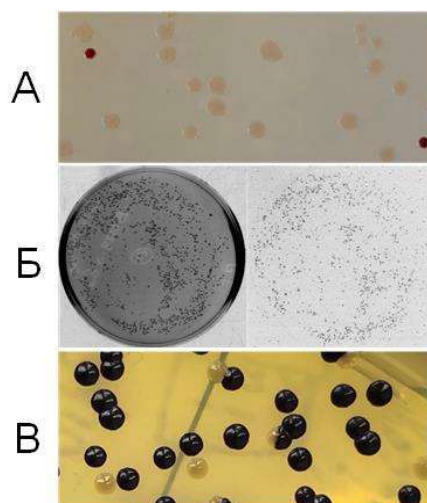


Рисунок 22. Фенотипы, контролируемые оперонами *scrKYABR* (А), *luxCDABE* (Б) и *vioABCDE* (В). (А) Фотография чашки, на которую были высеяны клетки штамма B2141, трансформированные кассетой *lac::scrKYABR*. Scr^+ рекомбинантов, способных утилизировать сахарозу (бесцветные колонии), отбирали на тетразолиевом агаре с добавлением 1% сахарозы и 25 мг/л хлорамфеникола. Красные колонии представляют собой спонтанных $Scr^- Cm^R$ мутантов. (Б) Фотография чашки, на которую были высеяны клетки штамма B1829[pRedCmOcr], трансформированные кассетой *ara::luxCDABE*. Люминесцентных рекомбинантов отбирали на среде LB с добавлением 0,2% L-арабинозы и 200 мг/л хлорамфеникола. Левая фотография была сделана с использованием GelDoc (BioRad) при освещении белым светом; правая - с выдержкой 300 с в темноте. (В) Фотография чашки, на которую были высеяны клетки штамма B1827[pRedCmOcr], трансформированные кассетой *lac::vioABCDE*. Рекомбинантов, продуцирующих виолацеин (фиолетовые колонии), отбирали на среде LB с добавлением 200 мг/л хлорамфеникола и инкубировали в течение 2 дней при комнатной температуре до тех пор, пока рекомбинантные колонии не приобретали темно-фиолетовый цвет. Бесцветные колонии представляют собой спонтанных Cm^R мутантов.

С использованием обеих вспомогательных конструкций, pRedCmOcr и хромосомного модуля *ocr-γβexo-P_L-cat*, были получены значения эффективности интеграции (доля рекомбинантов, обладающих желаемым фенотипом, среди всех Cm^R колоний) от 60 до 100% (рис. 23В). Эти результаты свидетельствуют, что частота возникновения спонтанных мутантов, избежавших гибели в условиях негативной селекции, была значительно ниже, чем частота интеграции.

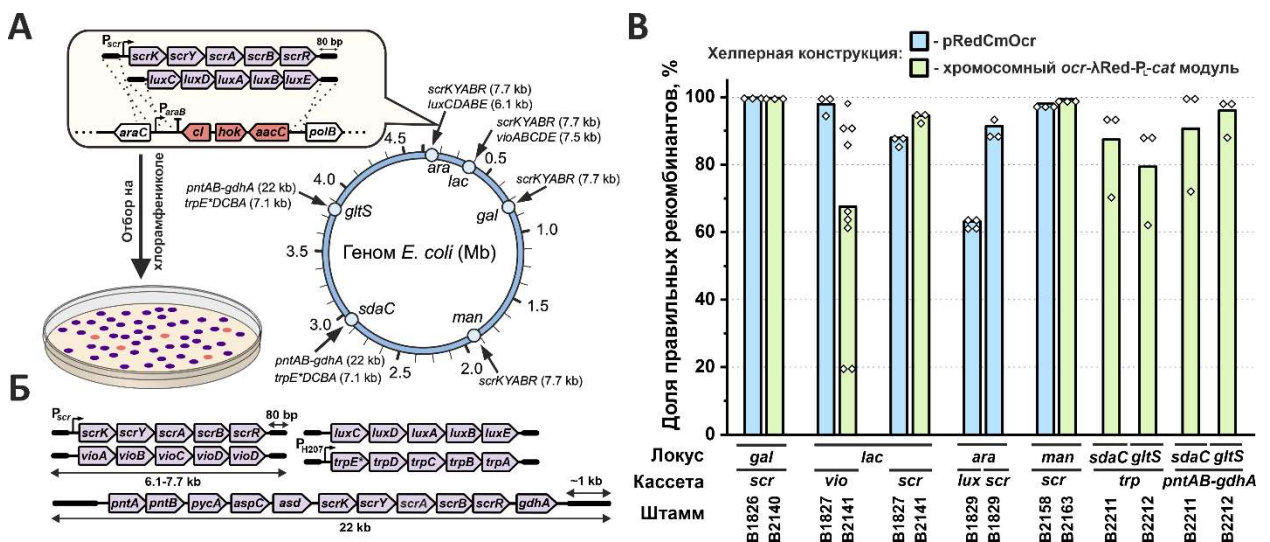


Рисунок 23. Интеграция немаркированных конструкций посредством негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема экспериментов по оценке эффективности интеграции. При электропорации линейная кассета (показана фиолетовым цветом) заменяет кассету *cl-hok* в определенном локусе (*ara* на рисунке) посредством рекомбинации λ Red, тем самым обеспечивая отбор рекомбинантов по устойчивости к хлорамфениколу в результате дерепрессии модуля P_{L-cat} в составе плазмиды pRedCmOcr или хромосомной вспомогательной конструкции *ocr- γ hexo- P_{L-cat}* . Целевые геномные локусы обозначены незакрашенными кружками вдоль хромосомы. Значение в скобках рядом с названием кассеты обозначает ее длину. (Б) Схема кассет, используемых для оценки эффективности интеграции. Указана общая длина кассет и фланкирующих участков гомологии. Кассеты были подготовлены, как описано в разделе 2.7 «Получение интегративных кассет». Звездочка в обозначении «*trpE**» означает аминокислотную замену S40F в антранилатсинтазе, которая делает фермент нечувствительным к ингибированию L-триптофаном. (Б) Эффективность интеграции кассет. Индуцированные клетки трансформировали 0,4–1 мкг кассеты, культивировали в течение ночи в 20 мл LB и высевали на чашки LB с хлорамфениколом и добавками, позволяющими различать рекомбинантов как описано в разделе 2.9 «Интеграция посредством негативной селекции *cl-hok* и идентификация рекомбинантов». Колонии, проявляющие желаемый фенотип (утилизация сахарозы, продукция виолацеина или люминесценция), считали рекомбинантными. Для каждой кассеты по крайней мере семь рекомбинантных колоний рассевали и использовали для проверки наличия конструкции в целевом локусе с помощью локус-специфической ПЦР (рис. 24). В экспериментах с *trp*-кассетами по 16 колоний Cm^R на каждую повторность тестировали с использованием локус-специфичной ПЦР без фенотипического скрининга. Наличие модуля *pntAB-gdhA* в локусах *sdaC* и *gltS* было дополнительно подтверждено секвенированием по Сэнгеру стыков между конструкцией и хромосомой. Долю правильных рекомбинантов рассчитывали путем деления титра рекомбинантов на общее количество Cm^R колоний. Столбцы обозначают среднюю эффективность интеграции, а

незакрашенные ромбы указывают точные значения для каждой биологической повторности.

Более того, ПЦР-анализ показал, что часть колоний, признанных нерекомбинантными исходя из фенотипического анализа, также содержали кассеты в целевых локусах. В частности, 9 из 24 нелюминесцентных колоний и 10 из 10 колоний Scr^- , полученных в экспериментах с кассетами *ara::luxCDABE* и *gal::scrKYABR*, несли конструкцию, встроенную в *gal* и *ara*, соответственно (рис. 24). Соответствующий фенотип у этих клонов не развивался, по-видимому, в результате мутаций, возникающих в ходе ПЦР-амплификации кассеты.

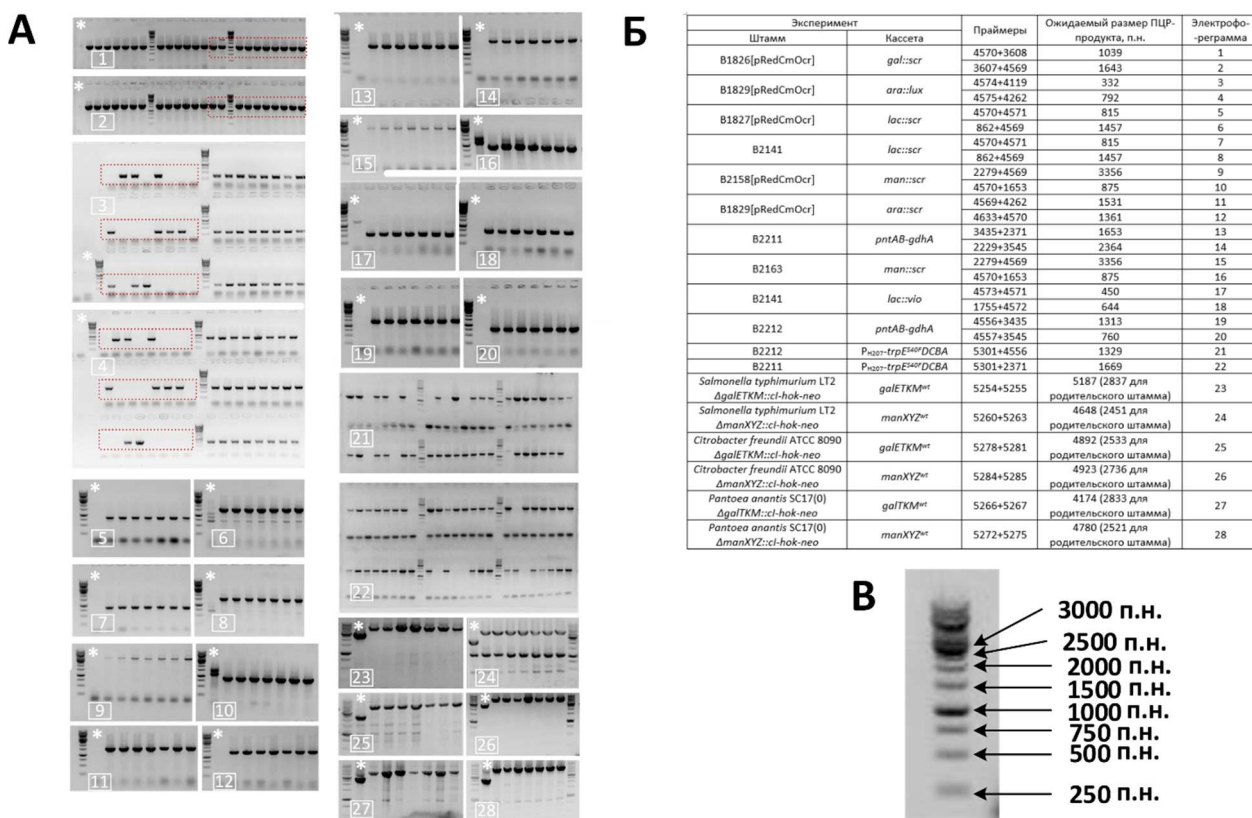


Рисунок 24. Проверка интеграции линейных кассет в целевые геномные локусы с помощью локус-специфичной ПЦР. (А) Продукты ПЦР, соответствующие точкам соединения между хромосомой и кассетой, разделённые с помощью гель-электрофореза. Две электрофореграммы, за исключением экспериментов с *Salmonella typhimurium* LT2, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Pantoea ananatis* SC(0), соответствуют одному эксперименту по интеграции, показанному на рис. 23А. В случае этих бактерий наличие нужной модификации проверяли с помощью одной пары внешних праймеров. Число в белом квадрате — это порядковый номер электрофореграммы. Красная пунктирная рамка указывает на клоны, которые были признаны

нерекомбинантными при фенотипическом скрининге, но, по результатам ПЦР-теста, содержали кассету целевом локусе. Остальные клоны были выбраны случайным образом среди тех, которые проявляли фенотип, придаваемый клеткам интегрируемой конструкцией. Белые звездочки обозначают отрицательный контроль, представляющий собой ПЦР с колонии родительского штамма. (Б) В таблице представлены ПЦР, используемые для проверки правильной интеграции кассеты в целевой геномный локус. Перечислены пары праймеров для амплификации точек соединения между геномной последовательностью и последовательностью кассеты, а также ожидаемые длины получаемых ПЦР-продуктов. Номера электрофореграмм соответствуют указанным на рис. 28А. (С) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), используемый в качестве маркера для гель-электрофореза.

Можно предположить, что оценка эффективности интеграции могла быть искажена из-за длительного роста трансформированных клеток в жидкой среде, необходимого для падения внутриклеточной концентрации CI и дерепрессии P_L-cat . Действительно, более быстрый рост рекомбинантов по сравнению с родительским штаммом может привести к завышению видимой доли рекомбинантных колоний. Чтобы исключить такую возможность, были измерены скорости роста для каждой пары родительского и рекомбинантного штамма, несущего в хромосоме кассету *scr*, *vio* и *lux*. Однако, таких пар, для которых соотношение скоростей роста способствовало бы завышению доли рекомбинантов, обнаружено не было (рис. 25А и 25Б).

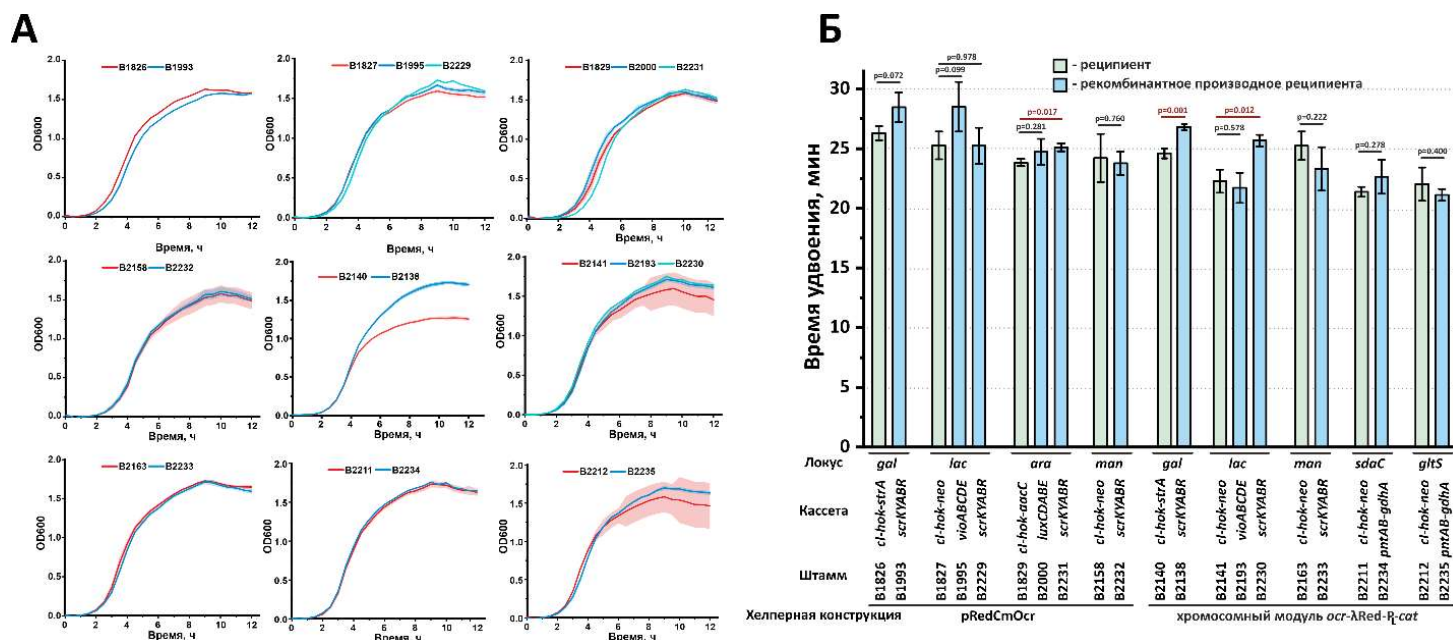


Рисунок 25. Сравнение роста штаммов-реципиентов, использованных для интеграции кассет *scr*, *vio*, *lux* и *pntAB-gdhA*, и полученных из них рекомбинантных штаммов. (А) Кривые роста тестируемых штаммов в среде LB без добавок. Генотип этих штаммов (целевой локус и интегрированная конструкция), указан в легенде под горизонтальной осью на панели Б. Эксперимент проводили, как описано в разделе 2.16 «Измерение роста клеток и *in vivo* люминесценции» за исключением того, что биолюминесценция не отслеживалась. Для экспериментов с парами, включающими штаммы, сконструированные с использованием pRedCmOcr, штамм-реципиент и его рекомбинантное производное трансформировали этой плазмидой, а посевные культуры растили в присутствии 200 мг/л ампициллина. Приведенные кривые роста представляют собой средние значения шести технических повторностей (шесть лунок, инокулированных одной ночной культурой), затененные области обозначают SD. (Б) Время удвоения было рассчитано с использованием кривых роста, показанных на панели А. Значения являются средними для шести технических повторств; планки погрешностей указывают SD. Значения сравнивали с использованием *t*-критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Показаны двусторонние *p*-значения. Значения *p*, выделенные красным цветом, указывают пары, в которых разница в среднем времени удвоения была значимой при уровне значимости 0,05.

3.3.6 Негативная селекция *cI-hok* в сочетании с λ Red-рекомбинацией – удобный инструмент для задач метаболической инженерии

Полученные результаты свидетельствуют о том, что негативная селекция *cI-hok* в сочетании с λ Red-рекомбинацией позволяет легко интегрировать в хромосому не содержащие селективных маркеров ПЦР-фрагменты длиной до 7,7 т.п.о. Возможность встроить в геном целые опероны имеет важное значение для задач метаболической инженерии, в рамках которых зачастую требуется привести гетерологичные биосинтетические пути или каким-либо образом изменить нативные. Возможность использовать разработанную стратегию была продемонстрирована в задачах по созданию штаммов, продуцирующих L-триптофан и L-треонин. Так, для создания продуцента L-триптофана в локусы *gltS* и *sdaC* был параллельно интегрирован оперон P_{H207} -*trpE*^{S40F}*DCBA* (рис. 23А и 23Б). Эта конструкция кодирует структурные гены пути биосинтеза L-триптофана (рис. 26А) с несколькими дополнительными мутациями по отношению к последовательности дикого типа. В частности, нативный промотор и аттенуатор *trpL* были заменены сильным конститутивным промотором P_{H207} , а также была введена аминокислотная замена S40F в последовательность TrpE, в результате чего антранилатсинтаза становится нечувствительной к ретроингибированию L-триптофаном (Caligiuri et al., 1991). В экспериментах по интеграции этой конструкции в геном штаммов B2211 и B2212 от 63 до 94% Cm^R колоний несли кассету P_{H207} -*trpE*^{S40F}*DCBA* в целевом локусе (рис. 24). Полученные рекомбинанты накапливали 1,4–1,5 г/л L-триптофана за 24 ч культивирования (рис. 26Б).

Чтобы увеличить способность штамма к накоплению L-треонина, была сконструирована кассета *pntAB-gdhA* длиной 22 т.п.н. (рис. 23А и Б), содержащую шесть генов, контролирующие реакции биосинтеза L-треонина (*asd*, *aspC*), ассимиляции NH₄⁺ (*gdhA*), реакции карбоксилирования пирувата (*pusA*) и регенерации НАДФН (*pntAB*) (рис. 27А). Кроме того, этот модуль

содержал оперон *scrKYABR*, контролирующий утилизацию сахарозы и служащий фенотипическим маркером. Модуль *pntAB-gdhA* был сконструирован в составе автономной плазмиды, после чего линейная кассета с областями гомологии длиной приблизительно 1 т.п.н. была получена путём обработки плазмиды эндонуклеазами рестрикции и использована для замены кассеты *cI-hok-neo* в генах *sdaC* и *gltS*. По сравнению с несколькими тысячами Cm^R колоний в экспериментах с интегративными кассетами меньшего размера, трансформация *pntAB-gdhA* давала только 50–200 колоний, что указывает на то, что *pntAB-gdhA* приближается к верхнему пределу размера фрагментов ДНК, которые могут быть интегрированы посредством рекомбинации λ Red. Тем не менее, 72–100% Cm^R колоний были рекомбинантами вне зависимости от целевого локуса (рис. 23В). Мутация $\Delta sdaC::pntAB-gdhA$ была затем перенесена штамм-продуцент L-треонина В2122 посредством двухэтапной трансдукции фагом P1 как описано в разделе 3.5.7. Полученные рекомбинанты накапливали на ~50% больше L-треонина по сравнению с предком (рис. 27Б)

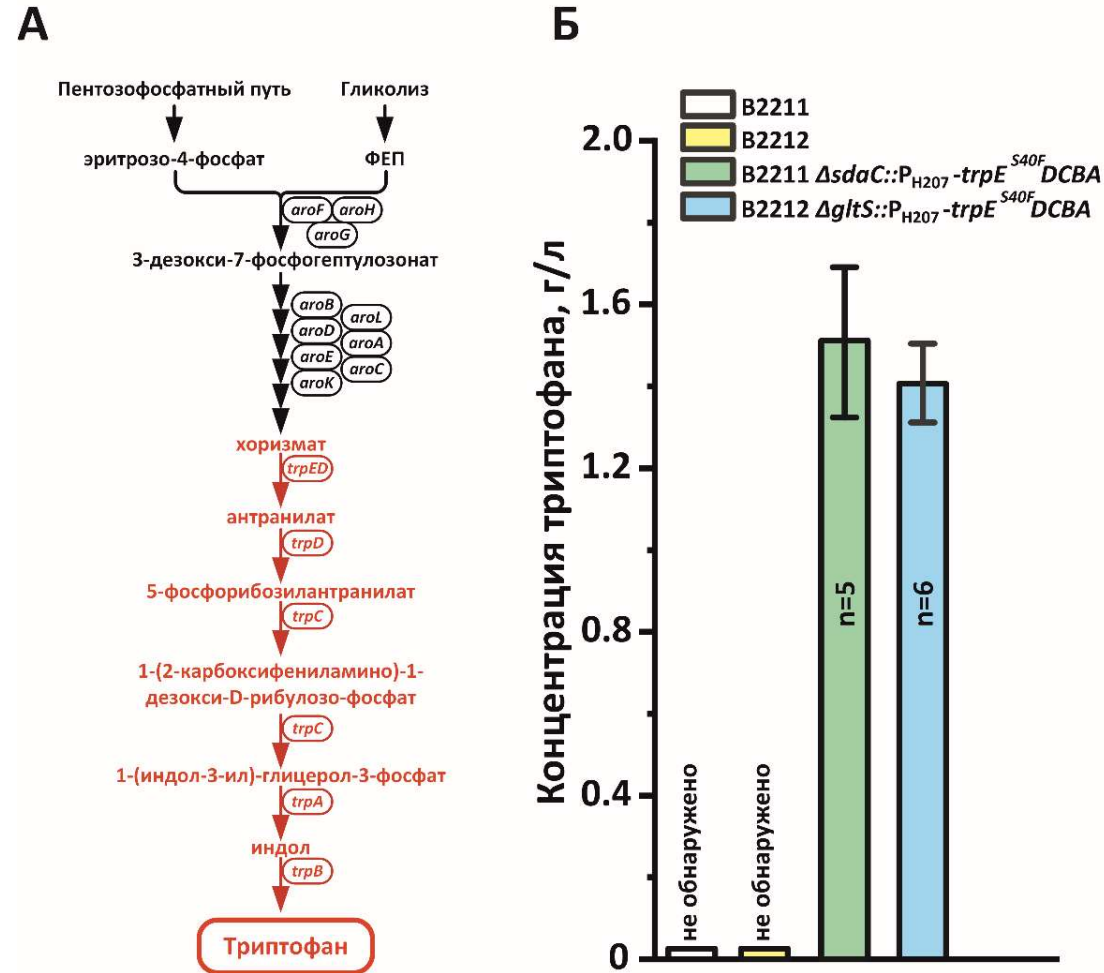


Рисунок 26. Конструирование продуцента L-триптофана. (А) Метаболическая карта пути биосинтеза L-триптофана. Красные линии и текст обозначают реакции и ферменты, затронутые интеграцией конструкции $P_{H207}-trpE^{S40F}DCBA$ в хромосому штаммов B2211 и B2212. (Б) Накопление L-триптофана культурой штаммов B2211 $\Delta sdaC::P_{H207}-trpE^{S40F}DCBA$ и B2212 $\Delta gltS::P_{H207}-trpE^{S40F}DCBA$. Клетки культивировали и оценивали содержание L-триптофана в культуральной жидкости как описано в разделе 2.12 «Оценка способности штаммов к накоплению аминокислот». Показанные значения являются средними для указанного количества биологических повторов; планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

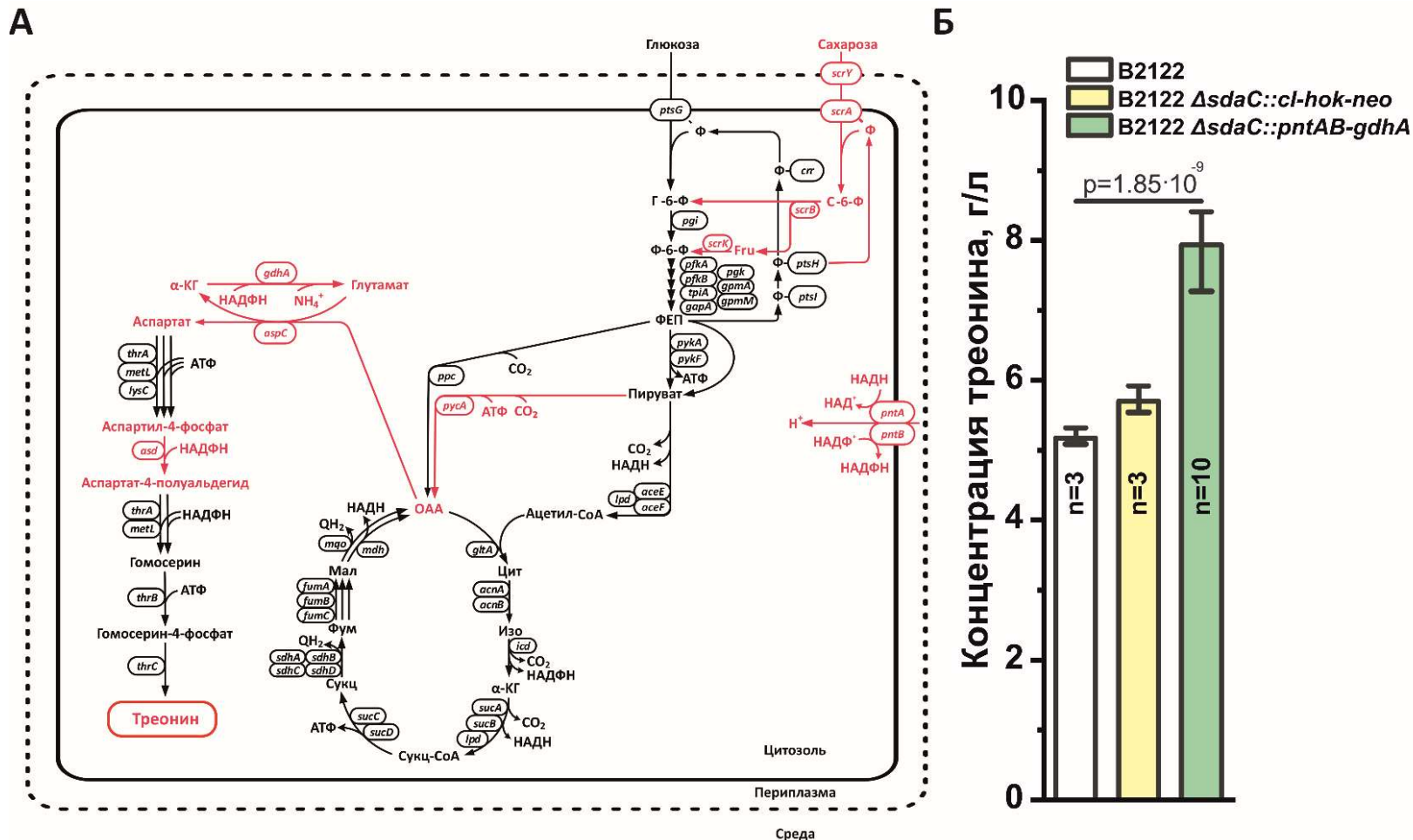


Рисунок 27. Конструирование продуцента L-треонина. (А) Метаболическая карта пути биосинтеза L-треонина. Красные линии и текст обозначают реакции и ферменты, затронутые интеграцией кластера генов *pntAB-gdhA* в хромосому штамма B2122. (Б) Накопление L-треонина культурой B2122 $\Delta sdaC::cl-hok-neo$, B2122 $\Delta sdaC::pntAB-gdhA$ и родительским штаммом. Клетки культивировали и оценивали содержание L-треонина в культуральной жидкости как описано в разделе 2.12 «Оценка способности штаммов к накоплению аминокислот». Показанные значения являются средними для указанного количества биологических повторов; планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению. Значения сравнивали *t*-тестом Стьюдента с неравными дисперсиями; показано двустороннее *p*-значение.

3.3.7 Перенос немаркированных геномных локусов между штаммами с помощью негативной селекции *cI-hok*

Помимо интеграции синтетических фрагментов ДНК в геном, эффективная стратегия негативной селекции может служить для переноса немаркированных участков хромосомы между штаммами. Для этого целевой локус реципиента должен быть предварительно маркирован маркером негативной селекции, после чего в клетки полученного штамма вводят геномную ДНК донора либо с помощью общей неспецифической трансдукции фагом P1, либо электропорации фрагментированной геномной ДНК (Khetrapal et al., 2015). В результате рекомбинации между экзогенной ДНК и хромосомой реципиента целевой локус будет заменён локусом донора, а маркер будет удалён. Благодаря этому правильные рекомбинанты получают способность расти в селективных условиях.

Возможность применения негативной селекции *cI-hok* для этих задач была исследована на примере оперонов *galETKM*, *lacZYA*, *araBAD* и *manXYZ*, каждый из которых был инактивирован кассетой *cI-hok* (рис. 28А). Клетки полученных штаммов заражали фагом P1vir, полученным в результате инфекции дикого штамма MG1655, либо трансформировали геномной ДНК этого же штамма, после чего высевали на селективную индикаторную среду с хлорамфениколом и подсчитывали долю колоний, которые приобрели способность утилизировать D-галактозу, лактозу, L-арабинозу или маннозу. С использованием обоих методов доля правильных рекомбинантов достигала 80-100% (рис. 28Б) с одним лишь исключением в случае эксперимента по восстановлению дикого оперона *lacZYA* в штамме B2141, несущем хромосомный модуль *ocr-γβexo-P_L-cat*, в котором доля Lac⁺-рекомбинантов составляла 6-13%. В эксперименте с изогенным штаммом B1827[pRedCmOcr] частота составляла от 80 до 100%. Эти наблюдения свидетельствуют о некотором взаимодействии между поступающей ДНК и вспомогательной конструкцией. Хромосомный вспомогательный модуль *ocr-γβexo-P_L-cat* в

хромосоме B2141 находится под контролем промотора $P_{AlacO-1}$ и второй копии гена *lacI*, сверхэкспрессированной в результате замены нативного промотора сильным промотором P_{H207} . Примечательно, что уровень экспрессии LacI настолько высок, что штаммы, несущие эту хромосомную конструкцию и интактный оперон *lacZYA*, проявляют частичный Lac⁻-фенотип на агаре с тетразолием и лактозой. Таким образом, падение доли правильных рекомбинантов в случае переноса оперона *lacZYA* в штамм B2141 может быть вызвано взаимодействием между LacI и его сайтами связывания в составе поступающей ДНК. Действительно, при попытке перенести мутацию $\Delta[lacI-lacZYA]::scrKYABR$ из B2229 в B2141 доля правильных рекомбинантов была близка к 100% (рис. 28Б). Нужно отметить, что в конструкции $\Delta[lacI-lacZYA]::scrKYABR$ удалены все три *lac*-оператора, расположенные в области *lacI-lacZYA*.

С другой стороны, в случае трансдукции P1 или электропорации геномной ДНК, попадающий в клетку фрагмент имеет длину ~90 т.п.н. и ~30 т.п.н., соответственно. Поскольку в обоих случаях хромосома фрагментируется случайным образом, в смеси в равных долях присутствуют фрагменты, которые несут сайты *lacO* как на концах, так и в центре. Маловероятно, что LacI может ингибировать рекомбинацию вдали от своего сайта связывания. Таким образом, сделать однозначный вывод о причине падения доли Lac⁺-рекомбинантов нельзя. Однако, на практике эту проблему можно легко обойти путем рационального выбора подходящей вспомогательной конструкции.

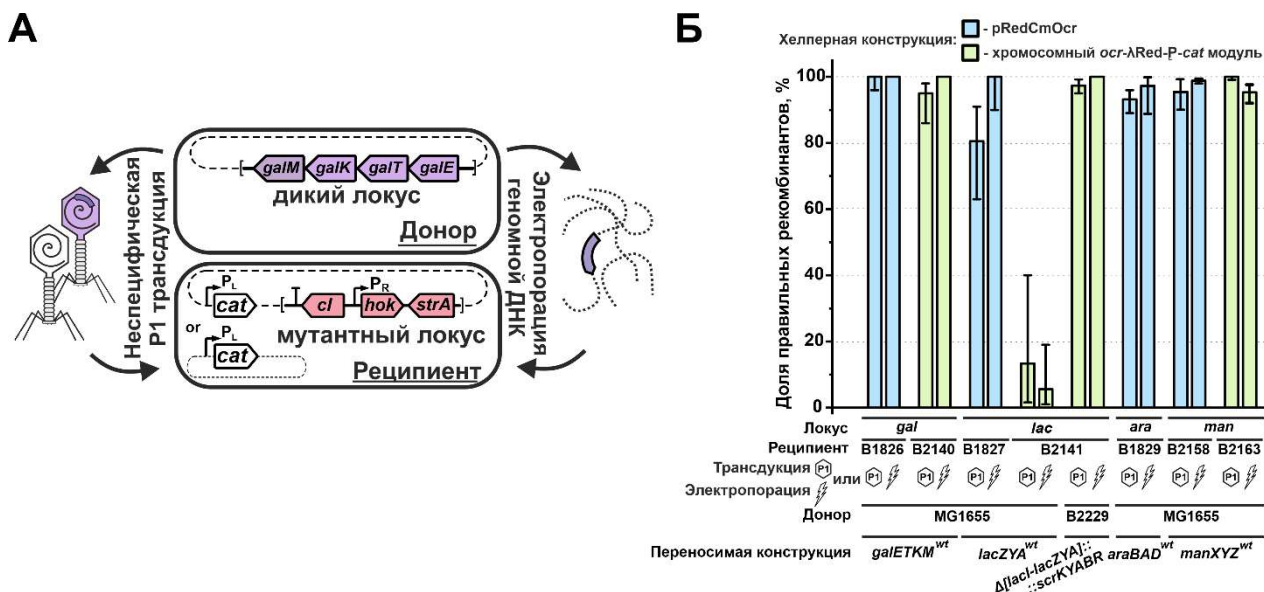
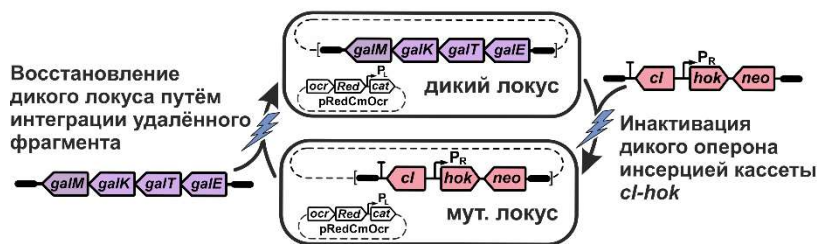


Рисунок 28. Перенос немаркированных геномных локусов при помощи негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема экспериментов по переносу хромосомных локусов (в данном случае оперона *galETKM*) между штаммами. Участок хромосомы дикого штамма-донора, соответствующий точке интеграции *cl-hok* в штамме-реципиенте, переносили либо P1-трансдукцией, либо электропорацией. При рекомбинации кассета *cl-hok* заменяется диким локусом, в результате чего рекомбинантные колонии могут быть отобраны по устойчивости к хлорамфениколу, развивающейся из-за дерепрессии модуля P_L -*cat* в составе pRedCmOcr или хромосомной вспомогательной конструкции *ocr- γ hexo-P-cat*. (Б) Эффективность переноса локусов *gal*, *lac*, *ara* и *man*. Штамм-реципиент был инфицирован $0,5 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^8$ фаговых частиц P1vir, полученных с использованием донорных штаммов MG1655 или B2229. В качестве альтернативы, 2–2,5 мкг геномной ДНК (фрагментированной до ~30 т.п.н.) из этих штаммов трансформировали в клетки реципиента, индуцированные для экспрессии оперона *ocr- γ hexo*. Вслед за этим клетки ресуспендировали в 20 мл LB и растили в течение ночи. Рекомбинантов отбирали на тетразолиевом агаре с хлорамфениколом и добавлением D-галактозы, лактозы, L-арабинозы или сахарозы (см. раздел 2.17 «Перенос немаркированных геномных локусов между штаммами»). Cm^R колонии, восстановившие способность утилизировать эти углеводы, считали рекомбинантными. Долю правильных рекомбинантов рассчитывали путем деления титра рекомбинантов на общее количество Cm^R колоний. Показанные значения представляют собой результат одной биологической повторности, планки погрешностей указывают 95% доверительный интервал Клоппера-Пирсона для пропорции.

3.3.8 Адаптация негативной селекции *cI-hok* и λ Red-рекомбинации к немодельным энтеробактериям

На последнем этапе настоящей работы была протестирована возможность применения негативной селекции *cI-hok* для модификации генома бактерий, отличных от *E. coli*. В качестве объектов были выбраны *Salmonella typhimurium* LT2 (McClelland et al., 2001), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (Wan et al., 2020) и *Pantoea ananatis* SC17(0) (Katashkina et al., 2009; Hara et al., 2012). Для работы с этими микроорганизмами потребовалось внести изменения во вспомогательные конструкции для экспрессии λ Red и Ocr. Так, плазмиду pRedCmOcr было невозможно трансформировать в клетки *Salmonella* и *Pantoea*, тогда в клетках *Citrobacter* она нормально реплицировалась. Для работы с *Salmonella* была получена pRedCmOcr^{SC101ts}, несущая модуль *ocr- γ bexO- P_L -cat* под контролем промотора $P_{AllacO-1}$ и репрессора LacI из хромосомы штамма B2137 и температурочувствительный ориджин репликации SC101^{ts}. Сходным образом, для *Pantoea* клонировали ту же конструкцию, но ориджин был заменен на RSF1010, обладающий широким кругом хозяев. Используя эти вспомогательные плазмиды, опероны *galETKM* (*galTKM* в случае *Pantoea*) и *manXYZ* во всех трех объектах были заменены на кассету *cI-hok-neo*. Затем удаленные опероны восстановили путём электропорации мутантных клеток амплифицированными фрагментами длиной 3,5–4,5 т.п.н., фланкированными областями гомологии длиной 80 п.н. Во всех экспериментах доля рекомбинантов составляла от 50 до 100% (рис. 29), что свидетельствовало о полной функциональности негативной селекции *cI-hok* в выбранных объектах.

А



Б

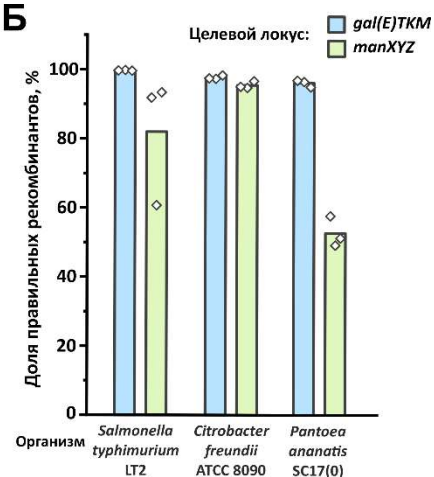


Рисунок 29. Негативная селекция *cl-hok* и Ocr-опосредованная λ Red рекомбинация в клетках *Salmonella*, *Pantoea* и *Citrobacter*. (А) Схема экспериментов по оценке эффективности интеграции. Сначала оперон *galETKM* (*galTKM* в случае *Pantoea*) или *manXYZ* делетировали кассетой *cl-hok-neo*. Затем на место кассеты *cl-hok-neo* интегрировали ПЦР-продукт, несущий оперон дикого типа. (Б) Эффективность интеграции кассет в локусы *gal* и *man* геномов *Salmonella*, *Citrobacter* и *Pantoea*. Для того, чтобы обеспечить функциональность *cl-hok* негативной селекции и λ Red рекомбинации клетки *Citrobacter*, *Salmonella* и *Pantoea* трансформировали плазмидами pRedCmOcr, pRedCmOcr^{SC101ts} и pRedCmOcr^{RSF}, соответственно. Методика интегративной трансформации и негативной селекции была аналогична использованной в экспериментах с *E. coli* с небольшими модификациями, которые описаны в разделе 2.9 «Интеграция посредством негативной селекции *cl-hok* и идентификация рекомбинантов». Рекомбинантов отбирали по устойчивости к хлорамфениколу на тетразолиевом агаре с добавлением либо 1% D-галактозы, либо 1% маннозы. Колонии с фенотипом Gal⁺ или Man⁺ считали рекомбинантными. Для каждой кассеты семь рекомбинантных колоний рассевали и использовали для проверки присутствия конструкции в целевом локусе с помощью локус-специфичной ПЦР (рис. 28). Долю правильных рекомбинантов рассчитывали путем деления титра рекомбинантов на общее количество Cm^R колоний. Столбцы указывают среднюю эффективность интеграции, а незакрашенные ромбы указывают точные значения, полученные для каждого повтора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология генетической инженерии с использованием Red-рекомбинации бактериофага λ появилась в 1998 году (Zhang et al., 1998; Muyrers, 1999) и благодаря своей гибкости и простоте революционизировала методы направленного получения мутаций в бактериальном геноме. Эта процедура обычно состоит из двух этапов – инсерции интегративной кассеты в хромосому с отбором рекомбинантов по устойчивости к антибиотику и последующего удаления этой кассеты при помощи маркера негативной селекции. Второй этап обычно рассматривают лишь как способ «бесшрамового» получения мутаций, тогда как его можно потенциально использовать для интеграции целевых конструкций путём отбора рекомбинантов, потерявших маркер.

Для такой задачи требуется маркер негативной селекции, обладающий исключительной устойчивостью к инаktivации в результате спонтанных мутаций. В настоящей работе описано создание такого маркера на основе комбинации репрессора CI фага λ и гена устойчивости к хлорамфениколу в составе модуля P_L-cat . Благодаря транскрипционной единице P_R-hok в составе единой интегративной кассеты $cl-hok$ подавляющее большинство спонтанных мутантов по гену cl погибают в результате дерепрессии токсина Нок. Таким образом, по сравнению кассетой без функционального hok скорость возникновения мутантов, способных выжить в условиях негативной селекции, снижается более, чем на два порядка. Экспериментальное сравнение показало, что маркер $cl-hok$ демонстрирует практически на три порядка большую эффективность, чем широко используемые $sacB$ и $rpsL$. Более того, анализ спонтанных устойчивых к хлорамфениколу мутантов в экспериментах со штаммами, несущими вспомогательный модуль $ocr-\gamma\beta\epsilon\alpha-P_L-cat$ в составе хромосомы, показал, что в подавляющем большинстве случаев они возникают вследствие спонтанных делеций, затрагивающих маркер $cl-hok$ и прилегающие области хромосомы. Известно, что такие делеции появляются вне зависимости от активности $RecA$ и не требуют наличия специфических

детерминант в последовательности ДНК, таких как прямые повторы (Uematsu et al., 1999; Mashimo et al., 2003). Таким образом, скоростью их возникновения вряд ли можно легко манипулировать. Учитывая эти аргументы, можно сделать вывод, что негативная селекция *cI-hok* достигает предельно возможной эффективности. Помимо этого, разработанная стратегия обладает другими существенными преимуществами перед известными подходами. В частности, отбор по устойчивости к хлорамфениколу – простая процедура, требующая лишь минимальной оптимизации пороговой концентрации хлорамфеникола в случае работы с различными штаммами. Во-вторых, при использовании pRedCmOcr функциональность негативной селекции *cI-hok* не требует предварительной модификации генома и может быть использована практически в любом штамме. В тоже время, для достижения максимально возможной эффективности негативной селекции в штамм можно перенести модуль *ocr- γ beta- P_L -cat*, в результате чего исчезает необходимость в поочерёдном введении и удалении вспомогательной плазмиды. Затем, при необходимости, эта хромосомная конструкция может быть легко удалена путём P1-трансдукции дикого локуса *ara* и отбора рекомбинантов по способности к утилизации L-арабинозы.

В настоящей работе было показано, что негативная селекция *cI-hok* обладает достаточной эффективностью для интеграции фрагментов ДНК, не содержащих маркеров устойчивости к антибиотикам, путем отбора рекомбинантов, потерявших маркер. Вместе с тем, эксперименты показали, что система рестрикции-модификации EcoKI накладывает существенное ограничение на использование этого подхода, если интегративная кассета была синтезирована с помощью ПЦР и неметилирована. Это ограничение было снято в результате коэкспрессии оперона *γ beta* и антирестрикционной функции *ocr* бактериофага T7, что сделало возможным простое и удобное клонирование протяжённых ПЦР-продуктов, включающих в себя целые опероны, в произвольные локусы хромосомы бактерий, несущих дикий аллель *hsdR*. А увеличение фланкирующих кассету областей гомологии до 1 т.п.н.

позволило интегрировать кластер из 11 генов длиной более 20 т.п.н. При этом, в большинстве экспериментов доля правильных рекомбинантов находилась в диапазоне от 50 до 100%.

В случае применения негативной селекции для интеграции в геном каждый модифицируемый локус имеет вариант, маркированный кассетой *cl-hok*, содержащей ген устойчивости к антибиотику. Это свойство позволяет с лёгкостью комбинировать мутации между собой в одном штамме. Действительно, в настоящей работе была показана возможность переноса немаркированных локусов с помощью P1 трансдукции и отбора рекомбинантов, потерявших кассету *cl-hok*. Та же манипуляция может быть выполнена с использованием трансформации клеток реципиента фрагментированной геномной ДНК донора. Этот способ может быть предпочтителен при работе с микроорганизмами, для которых неизвестны трансдуцирующие фаги. Более того, этот способ предоставляет еще одну ценное преимущество. Длиной фрагментов геномной ДНК донора легко можно манипулировать *in vitro* с помощью обработки редкощепящими эндонуклеазами рестрикции. Это позволяет легко разделять близко сцепленные мутации, которые не могут быть разделены в ходе P1 трансдукции.

Разработанная стратегия с минорными изменениями оказалась применима к другим представителям порядка *Enterobacteriales*. В частности, эксперименты с *Salmonella*, *Pantoea* и *Citrobacter* показали, что эффективность интеграции ПЦР-продуктов с использованием негативной селекции *cl-hok* и Red-рекомбинации в сочетании с экспрессией Ocr достигает тех же значений, что были получены для *E. coli*. Такая универсальность может быть связана с несколькими особенностями этого подхода. Во-первых, известно, что репрессор CI в сочетании с промоторами P_R и P_L функционален даже в филогенетически отдалённых от *E. coli* бактериях, таких как *Bacillus subtilis* (Itaya, 1999; Itaya et al., 2000). Во-вторых, токсичность Hок навряд ли может быть снята антитоксинами Sok, принадлежащими к гомологичным парам

hok/sok, потенциально присутствующими в геномах других бактерий, так как механизм действия антисмысловой РНК *Sok* заключается в связывании с 5'-нетранслируемой областью транскрипта *hok* и подавлении его трансляции (Thisted et al., 1992). Следовательно, если *hok* помещен под контроль гетерологичного промотора, *Sok* не скажется на его экспрессии. Наконец, из литературы известно, что *Ocr* подавляет активность широкого спектра эндонуклеаз рестрикции I и III типов (Krüger et al., 1982; Krüger et al., 1983; Bandyopadhyay et al., 1985; Roberts et al., 2012). Это свойство может быть критически важным для работы с микроорганизмами, обладающими неизвестным паттерном рестрикции и модификации. Таким образом, перечисленные особенности в сочетании с полученными результатами свидетельствуют о том, что разработанная стратегия может быть универсальным методом геномной инженерии различных микроорганизмов, принадлежащих к порядку *Enterobacteriales* и, потенциально, может быть адаптирована к ещё более филогенетически отдалённым таксонам.

В заключение, в настоящей работе описано создание новой стратегии геномной инженерии микроорганизмов, объединяющая в себе эффективную негативную селекцию и Red-рекомбинацию, дополненную антирестрикционной функцией *T7ocr*, которые вместе позволяют интегрировать протяженные линейные фрагменты ДНК напрямую в бактериальную хромосому и использовать последнюю в качестве вектора общего назначения. Этот подход обладает рядом значительных преимуществ по сравнению с существующими методами и расширяет репертуар инструментов для исследований в области синтетической биологии и метаболической инженерии.

ВЫВОДЫ

1. Для интеграции протяжённых немаркированных фрагментов ДНК в хромосому *Escherichia coli* была создана стратегия негативной селекции на основе двухпромоторной системы P_L/P_R , её репрессора *CI*, гена устойчивости к хлорамфениколу *cat* и токсина Нок. Анализ спонтанных мутантов, выживающих в селективных условиях, свидетельствует о том, что эффективность этой стратегии достигает предельно высоких значений.
2. Было показано, что основным фактором, ограничивающим эффективность интеграции протяжённых неметилованных фрагментов ДНК в геном *Escherichia coli*, является эндонуклеаза *EcoKI*. Вместе с тем, частота рекомбинации может быть увеличена более чем на три порядка благодаря коэкспрессии генов *Red* и антирестрикционной функции *Osc* бактериофага T7.
3. Коэкспрессия генов *Red* и *T7Osc* позволяет встраивать немаркированные фрагменты ДНК длиной 6-8 т.п.н. в произвольные локусы хромосомы с отбором рекомбинантов, в геноме которых маркер *cl-hok* был заменён целевой конструкцией. При этом фрагменты могут быть синтезированы с помощью ПЦР с любой матрицы без необходимости конструировать интегративные кассеты на автономных векторах.
4. Негативная селекция *cl-hok* позволяет переносить немаркированные локусы хромосомы из одного штамма в другой с помощью P1-трансдукции или трансформации клеток реципиента фрагментированной геномной ДНК донора.
5. Технология интеграции в геном с помощью негативной селекции *cl-hok* и *Osc*-опосредованной *Red*-рекомбинации полностью функциональна в нескольких представителях порядка *Enterobacteriales*: *Salmonella typhimurium* LT2, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Pantoea ananatis* SC17(0) и, потенциально, может быть адаптирована для работы с

микроорганизмами, принадлежащими к более отдалённым в филогенетическом отношении таксонам.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albert H., Dale E. C., Lee E., Ow D. W. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome // *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 1995. V. 7. № 4. P. 649–659.
2. Alper H., Fischer C., Nevoigt E., Stephanopoulos G. Tuning genetic control through promoter engineering // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. V. 102. № 36. P. 12678–12683.
3. Anderson D. G., Churchill J. J., Kowalczykowski S. C. A Single Mutation, RecBD1080A Eliminates RecA Protein Loading but Not Chi Recognition by RecBCD Enzyme // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. V. 274. № 38. P. 27139–27144.
4. Antonovsky N., Gleizer S., Noor E., Zohar Y., Herz E., Barenholz U., Zelcbuch L., Amram S., Wides A., Tepper N., Davidi D., Bar-On Y., Bareia T., Wernick D. G., Shani I., Malitsky S., Jona G., Bar-Even A., Milo R. Sugar Synthesis from CO₂ in *Escherichia coli* // *Cell*. 2016. V. 166. № 1. P. 115–125.
5. Arnold D. A., Kowalczykowski S. C. Facilitated Loading of RecA Protein Is Essential to Recombination by RecBCD Enzyme // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. V. 275. № 16. P. 12261–12265.
6. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K. A., Tomita M., Wanner B. L., Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection // *Molecular Systems Biology*. 2006. V. 2. № 1. P. 2006.0008.
7. Bandyopadhyay P. K., Studier F. W., Hamilton D. L., Yuan R. Inhibition of the type I restriction-modification enzymes EcoB and EcoK by the gene 0.3 protein of bacteriophage T7 // *J Mol Biol*. 1985. V. 182. № 4. P. 567–578.
8. Bassalo M. C., Garst A. D., Halweg-Edwards A. L., Grau W. C., Domaille D. W., Mutalik V. K., Arkin A. P., Gill R. T. Rapid and Efficient One-Step Metabolic Pathway Integration in *E. coli* // *ACS Synth Biol*. 2016. V. 5. № 7. P. 561–568.

9. Bell J. C., Kowalczykowski S. C. RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine // Trends in biochemical sciences. 2016. V. 41. № 6. P. 491–507.
10. Benzer S. On the topography of the genetic fine structure // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1961. V. 47. № 3. P. 403–415.
11. Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E. T., Nagaraja Rao R., Schonher B. E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp. // Gene. 1992. V. 116. № 1. P. 43–49.
12. Bird A. W., Erler A., Fu J., Heriche J. K., Maresca M., Zhang Y., Hyman A. A., Stewart A. F. High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes // Nature Methods. 2011. V. 9. № 1. P. 103–109.
13. Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12 // Science. 1997. V. 277. № 5331. P. 1453–1462.
14. Boer H. A. de, Comstock L. J., Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1983. V. 80. № 1. P. 21–25.
15. Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L., Boyer H. W., Crosa J. H., Falkow S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system // Gene. 1977. V. 2. № 2. P. 95–113.
16. Brooks K., Clark A. J. Behavior of λ bacteriophage in a recombination deficient strain of Escherichia coli // Journal of virology. 1967. V. 1. № 2. P. 283–293.
17. Brophy J. A., Voigt C. A. Principles of genetic circuit design // Nature Methods. 2014. V. 11. № 5. P. 508–520.
18. Bubnov D. M., Yuzbashev T. V., Khozov A. A., Melkina O. E., Vybornaya T. V., Stan G.-B., Sineoky S. P. Robust counterselection and advanced λ Red recombineering enable markerless chromosomal integration of large heterologous constructs // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50. № 15. P. 8947–8960.

19. Bubnov D. M., Yuzbashev T. V., Vybornaya T. V., Netrusov A. I., Sineoky S. P. Development of new versatile plasmid-based systems for lambdaRed-mediated Escherichia coli genome engineering // Journal of Microbiological Methods. 2018. V. 151. P. 48–56.
20. Caligiuri M. G., Bauerle R. Identification of amino acid residues involved in feedback regulation of the anthranilate synthase complex from Salmonella typhimurium. Evidence for an amino-terminal regulatory site // J Biol Chem. 1991. V. 266. № 13. P. 8328–8335.
21. Callen B. P., Shearwin K. E., Egan J. B. Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter // Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. 2004. V. 14. № 5. P. 647–656.
22. Capaldo-Kimball F., Barbour S. D. Involvement of recombination genes in growth and viability of Escherichia coli K-12 // Journal of Bacteriology. 1971. V. 106. № 1. P. 204–212.
23. Carter D. M., Radding C. M. The role of exonuclease and beta protein of phage lambda in genetic recombination. II. Substrate specificity and the mode of action of lambda exonuclease // The Journal of biological chemistry. 1971. V. 246. № 8. P. 2502–2512.
24. Cassuto E. R. A., Radding C. M. Mechanism for the Action of λ Exonuclease in Genetic Recombination // Nature New Biology. 1971. V. 229. № 1. P. 13–16.
25. Cesareni G., Helmer-Citterich M., Castagnoli L. Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA // Trends in genetics : TIG. 1991. V. 7. № 7. P. 230–235.
26. Chang A. C., Cohen S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid // Journal of Bacteriology. 1978. V. 134. № 3. P. 1141–1156.
27. Choudhury A., Fankhauser R. G., Freed E. F., Oh E. J., Morgenthaler A. B., Bassalo M. C., Copley S. D., Kaar J. L., Gill R. T. Determinants for Efficient Editing

- with Cas9-Mediated Recombineering in *Escherichia coli* // *ACS Synth. Biol.* 2020. V. 9. № 5. P. 1083–1099.
28. Chung M.-E., Yeh I.-H., Sung L.-Y., Wu M.-Y., Chao Y.-P., Ng I.-S., Hu Y.-C. Enhanced integration of large DNA into *E. coli* chromosome by CRISPR/Cas9 // *Biotechnol Bioeng.* 2017. V. 114. № 1. P. 172–183.
29. Clark A. J., Margulies A. D. Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K12 // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1965. V. 53. № 2. P. 451–459.
30. Clark A. J., Sharma V., Brenowitz S., Chu C. C., Sandler S., Satin L., Templin A., Berger I., Cohen A. Genetic and molecular analyses of the C-terminal region of the *recE* gene from the *Rac* prophage of *Escherichia coli* K-12 reveal the *recT* gene // *Journal of Bacteriology.* 1993. V. 175. № 23. P. 7673–7682.
31. Copeland N. G., Jenkins N. A., Court D. L. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics // *Nature Reviews Genetics.* 2001. V. 2. № 10. P. 769–779.
32. Court R., Cook N., Saikrishnan K., Wigley D. The Crystal Structure of λ -Gam Protein Suggests a Model for RecBCD Inhibition // *Journal of Molecular Biology.* 2007. V. 371. № 1. P. 25–33.
33. Cox K. E. L., Schildbach J. F. Sequence of the R1 plasmid and comparison to F and R100 // *Plasmid.* 2017. V. 91. P. 53–60.
34. Crick F. H., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J. General nature of the genetic code for proteins // *Nature.* 1961. V. 192. P. 1227–1232.
35. Cui L., Bikard D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 9. P. 4243–4251.
36. Dabert P., Smith G. R. Gene replacement with linear DNA fragments in wild-type *Escherichia coli*: enhancement by Chi sites // *Genetics.* 1997. V. 145. № 4. P. 877–889.
37. 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 of the United States of America.* 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.

38. Datta S., Costantino N., Court D. L. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria // *Gene*. 2006. V. 379. P. 109–115.
39. Davison J. Mechanism of control of DNA replication and incompatibility in ColE1-type plasmids--a review // *Gene*. 1984. V. 28. № 1. P. 1–15.
40. Debabov V. G., Kozlov J. I., Khurges E. M., Livshits V. A., Zhdanova N. I., Gusyatiner M. M., Sokolov A. K., Bachina T. A., Yankovsky N. K., Tsygankov J. D., Chistoserdov A. J., Plotnikova T. G., Shakalis I. C., Belareva A. V., Arsatiants R. A., Sholin A. F., Pozdnyakova T. M. Bacterial strain of escherichia coli BKIIM B-3996 as the producer of l-threonine // 1996.
41. Deuschle U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H. Promoters of Escherichia coli: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. // *EMBO J*. 1986. V. 5. № 11. P. 2987–2994.
42. DeVito J. A. Recombineering with tolC as a Selectable/Counter-selectable Marker: remodeling the rRNA Operons of Escherichia coli // *Nucleic Acids Research*. 2007. V. 36. № 1. P. e4–e4.
43. Dixon D. The recombination hotspot χ is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the E. coli RecBCD enzyme // *Cell*. 1993. V. 73. № 1. P. 87–96.
44. Dixon D. A., Kowalczykowski S. C. The recombination hotspot chi is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the E. coli RecBCD enzyme // *Cell*. 1993. V. 73. № 1. P. 87–96.
45. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation // *Nucleic Acids Research*. 1988. V. 16. № 13. P. 6127–6145.
46. Echols H., Gingery R. Mutants of bacteriophage λ defective in vegetative genetic recombination // *Journal of Molecular Biology*. 1968. V. 34. № 2. P. 239–249.
47. Egan S. M., Schleif R. F. A regulatory cascade in the induction of rhaBAD // *Journal of Molecular Biology*. 1993. V. 234. № 1. P. 87–98.
48. Ellis H. M., Yu D., DiTizio T., Court D. L. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides //

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. V. 98. № 12. P. 6742–6746.
49. Enquist L. W., Skalka A. Replication of bacteriophage λ DNA dependent on the function of host and viral genes // *Journal of Molecular Biology*. 1973. V. 75. № 2. P. 185–212.
50. Erler A., Wegmann S., Elie-Caille C., Bradshaw C. R., Maresca M., Seidel R., Habermann B., Muller D. J., Stewart A. F. Conformational Adaptability of Red β during DNA Annealing and Implications for Its Structural Relationship with Rad52 // *Journal of Molecular Biology*. 2009. V. 391. № 3. P. 586–598.
51. Flamholz A. I., Dugan E., Blikstad C., Gleizer S., Ben-Nissan R., Amram S., Antonovsky N., Ravishankar S., Noor E., Bar-Even A., Milo R., Savage D. F. Functional reconstitution of a bacterial CO₂ concentrating mechanism in *Escherichia coli* // *Elife*. 2020. V. 9. P. e59882.
52. Foster P. L. Methods for determining spontaneous mutation rates // *Methods in enzymology*. 2006. V. 409. P. 195–213.
53. Franklin N. C. Deletions and functions of the center of the Φ 80- λ phage genome. Evidence for a phage function promoting genetic recombination // *Genetics*. 1967. V. 57. № 2. P. 301.
54. Gay P., Le Coq D., Steinmetz M., Berkelman T., Kado C. I. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria // *Journal of Bacteriology*. 1985. V. 164. № 2. P. 918–921.
55. Gerdes K., Bech F. W., Jørgensen S. T., Løbner-Olesen A., Rasmussen P. B., Atlung T., Boe L., Karlstrom O., Molin S., Meyenburg K. von. Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the *E. coli* relB operon // *EMBO J*. 1986. V. 5. № 8. P. 2023–2029.
56. Gerlach R. G., Holzer S. U., Jackel D., Hensel M. Rapid Engineering of Bacterial Reporter Gene Fusions by Using Red Recombination // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. V. 73. № 13. P. 4234–4242.

57. Gibson D. G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments // *Methods in enzymology*. 2011. V. 498. P. 349–361.
58. Gleizer S., Ben-Nissan R., Bar-On Y. M., Antonovsky N., Noor E., Zohar Y., Jona G., Krieger E., Shamshoum M., Bar-Even A., Milo R. Conversion of *Escherichia coli* to Generate All Biomass Carbon from CO₂ // *Cell*. 2019. V. 179. № 6. P. 1255- 1263.e12.
59. Gutterson N. I., Koshland D. E. Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered in vitro // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983. V. 80. № 16. P. 4894–4898.
60. Haldimann A., Daniels L. L., Wanner B. L. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon // *Journal of Bacteriology*. 1998. V. 180. № 5. P. 1277–1286.
61. Hamilton C. M., Aldea M., Washburn B. K., Babitzke P., Kushner S. R. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 1989. V. 171. № 9. P. 4617–4622.
62. Hara Y., Kadotani N., Izui H., Katashkina J. I., Kuvaeva T. M., Andreeva I. G., Golubeva L. I., Malko D. B., Makeev V. J., Mashko S. V., Kozlov Y. I. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012. V. 93. № 1. P. 331–341.
63. Hashimoto-Gotoh T., Sekiguchi M. Mutations of temperature sensitivity in R plasmid pSC101 // *Journal of Bacteriology*. 1977. V. 131. № 2. P. 405–412.
64. Haugan K., Karunakaran P., Blatny J. M., Valla S. The phenotypes of temperature-sensitive mini-RK2 replicons carrying mutations in the replication control gene *trfA* are suppressed nonspecifically by intragenic *cop* mutations // *Journal of Bacteriology*. 1992. V. 174. № 21. P. 7026–32.
65. Herendeen S. L., VanBogelen R. A., Neidhardt F. C. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures // *Journal of Bacteriology*. 1979. V. 139. № 1. P. 185–94.

66. Hershey A. D., Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage // *The Journal of general physiology*. 1952. V. 36. № 1. P. 39–56.
67. Hill F., Benes V., Thomasova D., Stewart A. F., Kafatos F. C., Ansorge W. BAC trimming: minimizing clone overlaps // *Genomics*. 2000. V. 64. № 1. P. 111–113.
68. Horii Z.-I., Clark A. J. Genetic analysis of the recF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* k12: Isolation and characterization of mutants // *Journal of Molecular Biology*. 1973. V. 80. № 2. P. 327–344.
69. Itaya M. Effective Cloning of Unmarked DNA Fragments in the *Bacillus subtilis* 168 Genome // *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999. V. 63. № 3. P. 602–604.
70. Itaya M., Nagata T., Shiroishi T., Fujita K., Tsuge K. Efficient cloning and engineering of giant DNAs in a novel *Bacillus subtilis* genome vector // *J Biochem*. 2000. V. 128. № 5. P. 869–875.
71. Iyer L. M., Koonin E. V., Aravind L. Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Redbeta, ERF and RAD52 // *BMC Genomics*. 2002. V. 3. P. 1–11.
72. Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins // *Journal of Molecular Biology*. 1961. V. 3. P. 318–356.
73. Jiang Y., Chen B., Duan C., Sun B., Yang J., Yang S. Multigene Editing in the *Escherichia coli* Genome via the CRISPR-Cas9 System // *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. V. 81. № 7. P. 2506–2514.
74. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
75. Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells // *Elife*. 2013. V. 2. P. e00471.
76. Juhas M., Ajioka J. W. Lambda Red recombinase-mediated integration of the high molecular weight DNA into the *Escherichia coli* chromosome // *Microb Cell Fact*. 2016. V. 15. № 1. P. 172.

77. Karu A. E., Sakaki Y., Echols H., Linn S. The gamma protein specified by bacteriophage gamma. Structure and inhibitory activity for the recBC enzyme of *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. 1975. V. 250. № 18. P. 7377–7387.
78. Katashkina J. I., Hara Y., Golubeva L. I., Andreeva I. G., Kuvaeva T. M., Mashko S. V. Use of the λ Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis* // *BMC Molecular Biology*. 2009. V. 10. № 1. P. 34.
79. Kellenberger-Gujer G., Weisberg R. Recombination in bacteriophage lambda I. Exchange of DNA promoted by phage and bacterial recombination mechanisms // *The bacteriophage lambda*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1971. C. 407–415.
80. Keseler I. M., Mackie A., Santos-Zavaleta A., Billington R., Bonavides-Martinez C., Caspi R., Fulcher C., Gama-Castro S., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Muniz-Rascado L., Ong Q., Paley S., Peralta-Gil M., Subhraveti P., Velazquez-Ramirez D. A., Weaver D., Collado-Vides J., Paulsen I., Karp P. D. The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12 // *Nucleic Acids Research*. 2017. V. 45. № D1. P. D543–D550.
81. Khetrapal V., Mehershahi K., Rafee S., Chen S., Lim C. L., Chen S. L. A set of powerful negative selection systems for unmodified *Enterobacteriaceae* // *Nucleic Acids Research*. 2015. V. 43. № 13. P. e83–e83.
82. Kitagawa M., Ara T., Arifuzzaman M., Ioka-Nakamichi T., Inamoto E., Toyonaga H., Mori H. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research // *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2005. V. 12. № 5. P. 291–299.
83. Kmiec E., Holloman W. K. Beta protein of bacteriophage lambda promotes renaturation of DNA // *The Journal of biological chemistry*. 1981. V. 256. № 24. P. 12636–12639.
84. Kovall R. Toroidal structure of lambda-exonuclease // *Science*. 1997. V. 277. № 5333. P. 1824–1827.

85. Kowalczykowski S. C., Eggleston A. K. Homologous Pairing and DNA Strand-Exchange Proteins // *Annual Review of Biochemistry*. 1994. V. 63. № 1. P. 991–1043.
86. Krüger D. H., Hansen S., Reuter M. The *ocr+* Gene Function of Bacteriophages T3 and T7 Counteracts the *Salmonella typhimurium* DNA Restriction Systems SA and SB // *Journal of Virology*. 1983. V. 45. № 3. P. 1147–1149.
87. Krüger D. H., Reuter M., Hansen S., Schroeder C. Influence of phage T3 and T7 gene functions on a type III(EcoP1) DNA restriction-modification system in vivo // *Mol Gen Genet*. 1982. V. 185. № 3. P. 457–461.
88. Kuhlman T. E., Cox E. C. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs // *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38. № 6. P. e92.
89. Kushner S. R., Nagaishi H., Clark A. J. Indirect Suppression of *recB* and *recC* Mutations by Exonuclease I Deficiency // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972. V. 69. № 6. P. 1366–1370.
90. Kwon Y. S., Kim J., Kang C. Viability of *E. coli* cells containing phage RNA polymerase and promoter: interference of plasmid replication by transcription // *Genetic analysis : biomolecular engineering*. 1998. V. 14. № 4. P. 133–139.
91. Lam S. T., Stahl M. M., McMilin K. D., Stahl F. W. Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda II. A mutation which causes hot spot activity // *Genetics*. 1974. V. 77. № 3. P. 425–433.
92. Lanzer M., Bujard H. Promoters largely determine the efficiency of repressor action // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988. V. 85. № 23. P. 8973–8977.
93. Leder P., Nirenberg M. W. RNA codewords and protein synthesis, 3. On the nucleotide sequence of a cysteine and a leucine RNA codeword // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1964. V. 52. P. 1521–9.
94. Lederberg J. Streptomycin resistance; a genetically recessive mutation // *Journal of Bacteriology*. 1951. V. 61. № 5. P. 549–550.

95. Lee E. C., Yu D., Martinez de Velasco J., Tessarollo L., Swing D. A., Court D. L., Jenkins N. A., Copeland N. G. A Highly Efficient Escherichia coli-Based Chromosome Engineering System Adapted for Recombinogenic Targeting and Subcloning of BAC DNA // *Genomics*. 2001. V. 73. № 1. P. 56–65.
96. Lee K. H., Park J. H., Kim T. Y., Kim H. U., Lee S. Y. Systems metabolic engineering of Escherichia coli for L-threonine production // *Molecular Systems Biology*. 2007. V. 3. P. 149.
97. Li M. Z., Elledge S. J. MAGIC, an in vivo genetic method for the rapid construction of recombinant DNA molecules // *Nature Genetics*. 2005. V. 37. № 3. P. 311–319.
98. Li X. t, Thomason L. C., Sawitzke J. A., Costantino N., Court D. L. Positive and negative selection using the tetA-sacB cassette: recombineering and P1 transduction in Escherichia coli // *Nucleic Acids Research*. 2013. V. 41. № 22. P. e204–e204.
99. Li Z., Karakousis G., Chiu S. K., Reddy G., Radding C. M. The beta protein of phage λ promotes strand exchange // *Journal of Molecular Biology*. 1998. V. 276. № 4. P. 733–744.
100. Little J. W., Lehman I. R., Kaiser A. D. An exonuclease induced by bacteriophage lambda. I. Preparation of the crystalline enzyme // *The Journal of biological chemistry*. 1967. V. 242. № 4. P. 672–678.
101. Loenen W. A., Murray N. E. Modification enhancement by the restriction alleviation protein (Ral) of bacteriophage lambda // *J Mol Biol*. 1986. V. 190. № 1. P. 11–22.
102. Luria S. E., Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance // *Genetics*. 1943. V. 28. № 6. P. 491–511.
103. Lutz R., Bujard H. Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements // *Nucleic Acids Research*. 1997. V. 25. № 6. P. 1203–1210.
104. Manly K. F., Signer E. R., Radding C. M. Nonessential functions of bacteriophage λ // *Virology*. 1969. V. 37. № 2. P. 177–188.

105. Maresca M., Erler A., Fu J., Friedrich A., Zhang Y., Stewart A. F. Single-stranded heteroduplex intermediates in λ Red homologous recombination // *BMC Molecular Biology*. 2010. V. 11. № 1. P. 54.
106. Marsić N., Roje S., Stojiljković I., Salaj-Smic E., Trgovcević Z. In vivo studies on the interaction of RecBCD enzyme and lambda Gam protein // *Journal of Bacteriology*. 1993. V. 175. № 15. P. 4738–4743.
107. Mashimo K., Kawata M., Yamamoto K. Roles of the RecJ and RecQ proteins in spontaneous formation of deletion mutations in the Escherichia coli K12 endogenous tonB gene // *Mutagenesis*. 2003. V. 18. № 4. P. 355–363.
108. Mashimo K., Nagata Y., Kawata M., Iwasaki H., Yamamoto K. Role of the RuvAB protein in avoiding spontaneous formation of deletion mutations in the Escherichia coli K-12 endogenous tonB gene // *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. V. 323. № 1. P. 197–203.
109. McClelland M., Sanderson K. E., Spieth J., Clifton S. W., Latreille P., Courtney L., Porwollik S., Ali J., Dante M., Du F., Hou S., Layman D., Leonard S., Nguyen C., Scott K., Holmes A., Grewal N., Mulvaney E., Ryan E., Sun H., Florea L., Miller W., Stoneking T., Nhan M., Waterston R., Wilson R. K. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2 // *Nature*. 2001. V. 413. № 6858. P. 852–856.
110. McMahon S. A., Roberts G. A., Johnson K. A., Cooper L. P., Liu H., White J. H., Carter L. G., Sanghvi B., Oke M., Walkinshaw M. D., Blakely G. W., Naismith J. H., Dryden D. T. F. Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance // *Nucleic Acids Res*. 2009. V. 37. № 15. P. 4887–4897.
111. Melkina O. E., Goryanin I. I., Zavilgelsky G. B. The DNA-mimic antirestriction proteins ArdA ColIB-P9, Arn T4, and Ocr T7 as activators of H-NS-dependent gene transcription // *Microbiological Research*. 2016. V. 192. P. 283–291.

112. Meselson M., Stahl F. W. The Replication of DNA in *Escherichia coli* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1958. V. 44. № 7. P. 671–682.
113. Meselson M., Weigle J. J. Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1961. V. 47. № 6. P. 857–868.
114. Meynial-Salles I., Cervin M. A., Soucaille P. New Tool for Metabolic Pathway Engineering in *Escherichia coli*: One-Step Method To Modulate Expression of Chromosomal Genes // Applied and Environmental Microbiology. 2005. V. 71. № 4. P. 2140–2144.
115. Mitsis P. G., Kwagh J. G. Characterization of the interaction of lambda exonuclease with the ends of DNA // Nucleic Acids Research. 1999. V. 27. № 15. P. 3057–3063.
116. Miyazaki K. Molecular engineering of a PheS counterselection marker for improved operating efficiency in *Escherichia coli* // BioTechniques. 2015. V. 58. № 2. P. 86–88.
117. Mizoguchi H., Sawano Y., Kato J. i, Mori H. Superpositioning of Deletions Promotes Growth of *Escherichia coli* with a Reduced Genome // DNA Research. 2008. V. 15. № 5. P. 277–284.
118. Muller-Hill B., Crapo L., Gilbert W. Mutants that make more lac repressor // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1968. V. 59. № 4. P. 1259–1264.
119. Muniyappa K., Radding C. M. The homologous recombination system of phage lambda. Pairing activities of beta protein // The Journal of biological chemistry. 1986. V. 261. № 16. P. 7472–7478.
120. Murphy K. λ Recombination and Recombineering // EcoSal Plus. 2016. V. 7. № 1. P. 10–1128.
121. Murphy K. C. Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme // Journal of Bacteriology. 1991. V. 173. № 18. P. 5808–5821.

122. Murphy K. C. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 1998. V. 180. № 8. P. 2063–2071.
123. Murphy K. C. The λ Gam Protein Inhibits RecBCD Binding to dsDNA Ends // *Journal of Molecular Biology*. 2007. V. 371. № 1. P. 19–24.
124. Murphy K. C., Campellone K. G., Poteete A. R. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli* // *Gene*. 2000. V. 246. № 1–2. P. 321–330.
125. Muyrers J. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination // *Nucleic Acids Research*. 1999. V. 27. № 6. P. 1555–1557.
126. Mythili Y., Muniyappa K. Formation of linear plasmid multimers promoted by the phage lambda Red-system in lon mutants of *Escherichia coli* // *Journal of General Microbiology*. 1993. V. 139. № 10. P. 2387–2397.
127. Nirenberg M. W., Matthaei J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1961. V. 47. P. 1588–1602.
128. Oliver D. B., Goldberg E. B. Protection of parental T4 DNA from a restriction exonuclease by the product of gene 2 // *Journal of Molecular Biology*. 1977. V. 116. № 4. P. 877–881.
129. Passy S. I., Yu X., Li Z., Radding C. M., Egelman E. H. Rings and filaments of protein from bacteriophage suggest a superfamily of recombination proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999. V. 96. № 8. P. 4279–4284.
130. Poteete A. R. Modulation of DNA Repair and Recombination by the Bacteriophage Orf Function in *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. 2004. V. 186. № 9. P. 2699–2707.
131. Poteete A. R., Sauer R. T., Hendrix R. W. Domain structure and quaternary organization of the bacteriophage P22 Erf protein // *Journal of Molecular Biology*. 1983. V. 171. № 4. P. 401–418.
132. Pyne M. E., Moo-Young M., Chung D. A., Chou C. P. Coupling the CRISPR/Cas9 System with Lambda Red Recombineering Enables Simplified

Chromosomal Gene Replacement in *Escherichia coli* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. V. 81. № 15. P. 5103–5114.

133. Radchenko E. A., McGinty R. J., Aksenova A. Y., Neil A. J., Mirkin S. M. Quantitative Analysis of the Rates for Repeat-Mediated Genome Instability in a Yeast Experimental System // *Genome Instability: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*. / под ред. M. Muzi-Falconi, G. W. Brown. New York, NY: Springer, 2018. С. 421–438.

134. Radding C. M. Nuclease activity in defective lysogens of phage λ // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1964. V. 15. № 1. P. 8–12.

135. Radding C. M. Regulation of lambda exonuclease. I. Properties of lambda exonuclease purified from lysogens of lambda T11 and wild type // *Journal of Molecular Biology*. 1966. V. 18. № 2. P. 235–250.

136. Reisch C. R., Prather K. L. J. Scarless Cas9 Assisted Recombineering (no-SCAR) in *Escherichia coli*, an Easy-to-Use System for Genome Editing // *Curr Protoc Mol Biol*. 2017. V. 117. P. 31.8.1-31.8.20.

137. Roberts G. A., Stephanou A. S., Kanwar N., Dawson A., Cooper L. P., Chen K., Nutley M., Cooper A., Blakely G. W., Dryden D. T. F. Exploring the DNA mimicry of the Ocr protein of phage T7 // *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40. № 16. P. 8129–8143.

138. Roca A. I., Cox M. M. RecA Protein: Structure, Function, and Role in Recombinational DNA Repair // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*. 1997. V. 56. P. 129–223.

139. Russell C. B., Thaler D. S., Dahlquist F. W. Chromosomal transformation of *Escherichia coli* recD strains with linearized plasmids // *Journal of Bacteriology*. 1989. V. 171. № 5. P. 2609–2613.

140. Rybalchenko N., Golub E. I., Bi B., Radding C. M. Strand invasion promoted by recombination protein of coliphage // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. № 49. P. 17056–17060.

141. Sabri S., Steen J. A., Bongers M., Nielsen L. K., Vickers C. E. Knock-in/Knock-out (KIKO) vectors for rapid integration of large DNA sequences, including whole metabolic pathways, onto the Escherichia coli chromosome at well-characterised loci // *Microbial Cell Factories*. 2013. V. 12. № 1. P. 60.
142. Sarkar S., Ma W. T., Sandri G. H. On fluctuation analysis: a new, simple and efficient method for computing the expected number of mutants // *Genetica*. 1992. V. 85. № 2. P. 173–179.
143. Scholz P., Haring V., Wittmann-Liebold B., Ashman K., Bagdasarian M., Scherzinger E. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010 // *Gene*. 1989. V. 75. № 2. P. 271–288.
144. Sergueev K., Yu D., Austin S., Court D. Cell toxicity caused by products of the p(L) operon of bacteriophage lambda // *Gene*. 2001. V. 272. № 1–2. P. 227–235.
145. Shulman M. J., Hallick L. M., Echols H., Signer E. R. Properties of recombination-deficient mutants of bacteriophage lambda // *Journal of Molecular Biology*. 1970. V. 52. № 3. P. 501–520.
146. Signer E. R., Weil J. Recombination in bacteriophage λ // *Journal of Molecular Biology*. 1968. V. 34. № 2. P. 261–271.
147. Silberstein Z., Maor S., Berger I., Cohen A. Lambda red-mediated synthesis of plasmid linear multimers in Escherichia coli K12 // *MGG Molecular & General Genetics*. 1990. V. 223. № 3. P. 496–507.
148. Sriprakash K. S., Lundh N., Huh M.-O., Radding C. M. The specificity of lambda exonuclease. Interactions with single-stranded DNA // *The Journal of biological chemistry*. 1975. V. 250. № 14. P. 5438–5445.
149. Stahl F., Stahl M. DNA Synthesis Associated with Recombination II. Recombination between Repressed Chromosomes // *The bacteriophage lambda* 1971. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, 1971. C. 443–453.
150. Stahl F. W. Recombination in phage λ : one geneticist's historical perspective // *Gene*. 1998. V. 223. № 1–2. P. 95–102.

151. Stahl F. W., Kobayashi I., Stahl M. M. In phage λ , *cos* is a recombinator in the red pathway // *Journal of Molecular Biology*. 1985. V. 181. № 2. P. 199–209.
152. Stahl F. W., McMilin K. D., Stahl M. M., Nozu Y. An Enhancing Role for DNA Synthesis in Formation of Bacteriophage Lambda Recombinants // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972a. V. 69. № 12. P. 3598–3601.
153. Stahl F. W., McMillin K. D., Stahl M. M., Malone R. E., Nozu Y., Russo V. E. A. A role for recombination in the production of “free-loader” lambda bacteriophage particles // *Journal of Molecular Biology*. 1972b. V. 68. № 1. P. 57–67.
154. Stahl F. W., Stahl M. M. Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. IV. Effect of heterology on Chi-stimulated crossing over // *Molecular & general genetics : MGG*. 1975. V. 140. № 1. P. 29–37.
155. Stahl F. W., Stahl M. M., Malone R. E. Red-mediated recombination of phage lambda in a *recA- recB-* host // *MGG Molecular & General Genetics*. 1978. V. 159. № 2. P. 207–211.
156. Stahl M. M., Thomason L., Poteete A. R., Tarkowski T., Kuzminov A., Stahl F. W. Annealing vs. invasion in phage lambda recombination // *Genetics*. 1997. V. 147. № 3. P. 961–977.
157. Stuber D., Bujard H. Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981. V. 78. № 1. P. 167–71.
158. Stueber D., Bujard H. Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes // *The EMBO Journal*. 1982. V. 1. № 11. P. 1399–404.
159. Subramanian K. The enzymatic basis of processivity in lambda exonuclease // *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31. № 6. P. 1585–1596.
160. Takano T. Behavior of Some Episomal Elements in a Recombination-Deficient Mutant of *Escherichia coli* // *Japanese Journal of Microbiology*. 1966. V. 10. № 4. P. 201–210.

161. Taylor A., Smith G. R. Unwinding and rewinding of DNA by the RecBC enzyme // *Cell*. 1980. V. 22. № 2. P. 447–457.
162. Thaler D. S., Stahl M. M., Stahl F. W. Double-chain-cut sites are recombination hotspots in the red pathway of phage λ // *Journal of Molecular Biology*. 1987. V. 195. № 1. P. 75–87.
163. Thisted T., Gerdes K. Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene // *Journal of Molecular Biology*. 1992. V. 223. № 1. P. 41–54.
164. Thomason L. C., Costantino N., Court D. L. E. coli genome manipulation by P1 transduction // *Curr Protoc Mol Biol*. 2007a. V. 79. № 1. P. 1.17.1-1.17.8.
165. Thomason L. C., Costantino N., Shaw D. V., Court D. L. Multicopy plasmid modification with phage λ Red recombineering // *Plasmid*. 2007b. V. 58. № 2. P. 148–158.
166. Thomason L. C., Court D. L., Datta A. R., Khanna R., Rosner J. L. Identification of the Escherichia coli K-12 ybhE gene as pgl, encoding 6-phosphogluconolactonase. // *J Bacteriol*. 2004. V. 186. № 24. P. 8248–8253.
167. Thoms B., Borchers I., Wackernagel W. Effects of Single-Strand DNases ExoI, RecJ, ExoVII, and SbcCD on Homologous Recombination of recBCD⁺ Strains of Escherichia coli and Roles of SbcB15 and XonA2 ExoI Mutant Enzymes // *Journal of Bacteriology*. 2007. V. 190. № 1. P. 179–192.
168. Tomizawa J., Som T. Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein // *Cell*. 1984. V. 38. № 3. P. 871–878.
169. Traub P., Nomura M. Streptomycin resistance mutation in Escherichia coli: altered ribosomal protein // *Science*. 1968. V. 160. № 3824. P. 198–199.
170. Trogovcević Z., Rupp W. D. Lambda bacteriophage gene produces and X-ray sensitivity of Escherichia coli: comparison of red-dependent and gam-dependent radioresistance // *Journal of Bacteriology*. 1975. V. 123. № 1. P. 212–221.

171. Uematsu N., Matsuoka C., Agemizu Y., Nagoshi E., Yamamoto K. Asymmetric crossing over in the spontaneous formation of large deletions in the tonB-trp region of the Escherichia coli K-12 chromosome // *Mol Gen Genet*. 1999. V. 261. № 3. P. 523–529.
172. Van Dyk T. K., Rosson R. A. Phototransduction in *Photobacterium luminescens* luxCDABE Promoter Probe Vectors // *Bioluminescence Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*TM. / под ред. R. A. LaRossa. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. C. 85–95.
173. Vybornaya T. V., Yuzbashev T. V., Fedorov A. S., Bubnov D. M., Filippova S. S., Bondarenko F. V., Sineoky S. P. Use of an Alternative Pathway for Isoleucine Synthesis in Threonine-Producing Strains of Escherichia coli // *Appl Biochem Microbiol*. 2020. V. 56. № 7. P. 759–769.
174. Wackernagel W., Radding C. M. Transfection by half molecules and inverted molecules of λ DNA: Requirement for *exo* and β -promoted recombination // *Virology*. 1973. V. 52. № 2. P. 425–432.
175. Wackernagel W., Radding C. M. Transformation and Transduction of Escherichia coli: The Nature of Recombinants Formed by *Rec*, *RecF*, and λ *Red* // *Mechanisms in recombination*. Boston, MA: Springer US, 1974. C. 111–122.
176. Walkinshaw M. D., Taylor P., Sturrock S. S., Atanasiu C., Berge T., Henderson R. M., Edwardson J. M., Dryden D. T. F. Structure of *Ocr* from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA // *Mol Cell*. 2002. V. 9. № 1. P. 187–194.
177. Wan K. H., Park S., Hess B. M., Neff M. J., Booth B. W., Celniker S. E. Complete Genome Sequence of the *Citrobacter freundii* Type Strain // *Microbiol Resour Announc*. 2020. V. 9. № 19. P. e00240-20.
178. Warming S., Costantino N., Court D. L., Jenkins N. A., Copeland N. G. Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection // *Nucleic Acids Research*. 2005. V. 33. № 4. P. e36–e36.
179. Weisberg R. A., Sternberg N. Transduction of *recB*- Hosts is Promoted by λ *red* + Function // *Mechanisms in recombination*. Boston, MA: Springer US, 1974. C. 107–109.

180. Wilkins A., Mistry J. Phage lambda's generalized recombination system // *MGG Molecular & General Genetics*. 1974. V. 129. № 4. P. 275–293.
181. Wilms B., Hauck A., Reuss M., Syldatk C., Mattes R., Siemann M., Altenbuchner J. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter // *Biotechnology and Bioengineering*. 2001. V. 73. № 2. P. 95–103.
182. Yu D., Ellis H. M., Lee E. C., Jenkins N. A., Copeland N. G., Court D. L. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. V. 97. № 11. P. 5978–5983.
183. Zerbini F., Zanella I., Fraccascia D., König E., Irene C., Frattini L. F., Tomasi M., Fantappiè L., Ganfini L., Caproni E., Parri M., Grandi A., Grandi G. Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in *Escherichia coli* // *Microbial Cell Factories*. 2017. V. 16. № 1. P. 68.
184. Zhang Y., Buchholz F., Muyrers J. P. P., Stewart A. F. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* // *Nature Genetics*. 1998. V. 20. № 2. P. 123–128.
185. Zissler J., Signer E., Schaefer F. The role of recombination in growth of bacteriophage lambda. I. The gamma gene // *The bacteriophage lambda*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1971. C. 455–468.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность (5'-3')*
862	ATTCCCAACCGCGTGGCACA
1653	GCGACCACGCCGGAGCA
1755	CACGACAGGTTTCCCGACT
2229	AATCTGGTAAACGCTGATGAC
2279	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCTAATACTTCTTACTCGCCCATCTG
2282	AAGACTTCGCTACCTGCCTG
2371	ATGTTTCTTACCACCCTCAC
2811	GAACACGGCATACTTTACGCAGCGGGAGTTCGGTTTTCTAGGAGTGGTAGTATATACACGAGTACATAC
2847	CCAAGACAGCTAAAGATCTCGGCGTATATCAAAGCGCGATCAACAAGGCCATAAATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
2848	CTCTGCCAGATGGCGCAATGCCATCTGGTATCACTTAAAGGTATTAACAAACAGGGTTTTCCAGTCACGA
3093	GACCGTAAAGTTCGCGTGATGGCAGCCGATATGAAAAATCAGCTCGACGAACCAGCAATAGACATAAGCG
3094	GCACTGTTACGACGGGTGTTGTATTCGCTGCCAACCAGGGTACGTTTGTATGTGACGGAAGATCACTTCG
3141	ATTTAACTCCTCTCTCAAATTTATCCACACATTTATACGAGCCGATGATTAATTGCAAAATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
3142	ACAACCTCCTTAGTACATCCACACATTTATACGAGCCGATGATTAATTGCAAAACAGGGTTTTCCAGTCACGA
3143	TTAAAAATTGGCGTCAATGCGTAAACGGCTCTGGGTATGGTTTGACTCATATTTAACTCCTCTCTCAAATT
3144	GGATGTACTAAGGAGTTGTATGTCCGAACAGCAGCGATT
3145	CGGAGCCGTACAAGCGTTACCGATTGTATGAAAAGCAGATTTAATACCAGTTAAAGCTTGGACTTGAAGCTG
3146	GTTCTGCCAGCAACTGACG
3147	GCTTGGTGTGCTTCCATCG
3148	TACGAATGCTTGTACAAGGTC
3149	AGATCAAAGGGGATGCTAACG
3150	GGTTGCCATGCGGATCAATC
3151	GGGCAAGGCCAATGTGATG

3152 TCAACGACATGGATCGCTAC
3153 ATGATGAACACGGTGTCTGC
3154 CATGGATATGTGAACGAACTC
3155 ATACAGCATATCGAGGTTCTG
3156 TGAAGGGACTTTTGTGTTGGAC
3182 CACAATCTCTGTTTGCCAACG
3183 AGGTCGCCCTTGCTCCAGC
3234 GCTGGATCAAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCTGTGACGGAAGATCACTTCG
3235 ATGGACCATTTCGGCACAGCCGGGAAGGGCTGGTCTTCATCCACGCGCACCAGCAATAGACATAAGCG
3236 CGCAGCGTCTCGGCCTGCCTGAAAAGCGTGGTGATTTCCGGCGGCGGTTTTGTGACGGAAGATCACTTCG
3237 TCGGCAATCAGAATGTCGCAGGTGGAAGTACCGATAACTTTTACCAGTGCACCAGCAATAGACATAAGCG
3435 ACATCATGCTGGATATCCACCA
3545 TGATAGATAACAAGAGCCATAAG
3607 ATCGCCAGCAAAAACTGGTGC
3608 TAACCTTCCTCTTTCAGCAGC
3960 CTGGTGATTTGAACAATATGAG
3961 GTCGGTAGTGCTGACCTTG
4027 ATGAGAGTTCTGGTTACCGGTGGTAGCGGTTACATTGGAAGTCATACCTGCAGGGTTTTCCAGTCACGA
4028 TTACTCAGCAATAAACTGATATTCCGTCAGGCTGGAATACTCTTCGCCAGATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
4029 ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGCAGGGTTTTCCAGTCACGA
4030 TTAAACTGACGATTCAACTTTATAATCTTTGAAATAATAGTGCTTATCCCATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
4031 ATGGCGATTGCAATTGGCCTCGATTTTGGCAGTGATTCTGTGCGAGCTTTCAGGGTTTTCCAGTCACGA
4032 TTACTGCCCGTAATATGCCTTCGCGCCATGCTTACGCAGATAGTGTATATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
4111 ATGAGAGTTCTGGTTACCGGTGGTAGCGGTTACATTGGAAGTCATACCTGTTTTTCGAAAAAGGCCCTCCCA
4112 TTACTCAGCAATAAACTGATATTCCGTCAGGCTGGAATACTCTTCGCCAGCCATCTGGTATCACTTAAAGG
4113 ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGTTTTTCGAAAAAGGCCCTCCCA
4114 TTAAACTGACGATTCAACTTTATAATCTTTGAAATAATAGTGCTTATCCCCATCTGGTATCACTTAAAGG
4115 TTGTGTGGAATTGTGAGCGG

4116 ATGCGGCTAATGTAGATCGC
4117 ATGGCGATTGCAATTGGCCTCGATTTTGGCAGTGATTCTGTGCGAGCTTTTTTCGAAAAAAGGCCTCCCA
4118 TTACTGCCCGTAATATGCCTTCGCGCCATGCTTACGCAGATAGTGTTCATCTGGTATCACTTAAAGG
4119 ACACTTTGCTATGCCATAGCA
4120 AACCAGGCTTGAGTATAGCC
4262 AAACCGCTCCATCAGATAGC
4362 GTGACCATTGCTATTGTTATAGGCACACATGGTTGGGCTGCAGAGCAGTTTTTCGAAAAAAGGCCTCCC
4363 TTACAGTCCCAGCAGGCCGCAAGCGTAACCAGCGATACCGATGACGAAGACCATCTGGTATCACTTAAAGG
4416 AAACCCCTGTGTTTTATAATCACTTAATCGCGCATAAAAAACGGCTAAAATCTTGTGTAAACGATTCCACTAATTTATTCCGCGGCTTTTTTAATATGTCCC
4417 TGAATATTGAGTTGCAAATATGTCGGTGTGCTGGTGATTTGAACAATATGAGATAAAGCCCTCATGACGAGGGCGTAACAGTTAGCGAACGTGGAGCACT
4418 CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTTGAATGAACCAAGGAATTTCTGTG
4419 TGTTCATGCCGGATGCGGCTAATGTAGATCGCTGAACTTGTAGGCCTGATAAGCGCAGCGTATCAGGCAATTTTTATAATATCCCTTGCGCCAAAAGGCG
4510 ATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGATGGAGTGAAACGCCGGGTACCGAGCTCGCG
4511 CGCCACGCTGAAAAATCCATCAAAAAACCAGGCTTGAGTATAGCCTGGTTTTCGTTTTGATTGGCTGTGGTTTTTATACAGTCATGGTTCGTCATCTACCTGCCTG
4556 CCATTTGTTTCATTAACAGCTGAG
4557 CTTCTGCGGGATGCGATTTC
4569 CTGCCAGAGATCGGGACG
4570 GATCAACGGCAATTACCACC
4571 CAGCTGTGGGTCAAAGAGG
4572 ATCTCGGCGGAGATGTTGG
4573 TGTGCGACATCCCGCTGG
4574 AATGTTATGCAACCGTAATTTCG
4575 TTCCGCCGTGGGTATATGC
4631 TTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTCACAACCGGCACTGTAAAACGACGGCCAGTGC
4632 ATGGCTGAAGCGCAAAATGATCCCCTGCTGCCGGGATACTCGTTTAAACGCCCATCTGGTATCACTTAAAGG
4633 CAGTCGCCCATCAAGCAGC
4634 AAAATTCATTTGCTAAACGCTTCAAATTCCTCGTATAATATACTTCATAAAATTGATAAACAAAAACCGGGTACCGAGCTCGCGCCATTCAGGCTGCGCAA
4635 AATGATACTTAGATTTCATCGAGAGGGACACGGCGACCGGGTACCGAGCTCGCGCCATTCAGGCTGCGCAA

4679 GACTTGTGAGCGGATAACAATGATACTTAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACCCGGGTACCGAGCTCGCGCCATTCAGGCTGCGCAA
4690 CTCCGTCAAGCCGTCAATTGTCTGATTCGTTACCAATTATGACAACTTGACCATCTGGTATCACTTAAAGG
4691 CACTGGCCGTCGTTTTACAGTGCCGGTTGTGAAGAAAAAGTGAATGATGTCCAAGCTTTTTTCGGGATCC
4692 CTCCGTCAAGCCGTCAATTGTCTGATTCGTTACCAATTATGACAACTTGATCACTGCCCCTTTCCAGTC
4693 TCGGGATCCTTTTTAAAAAATTCATTTGCTAAAACGCTTCAAATTTCTCGTATNNNATACTTCATAAAATTGATAAAACAAAAACCGGAAGAGAGTCAATTCAGG
4702 GATAACAATGATACTTAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACATCTAGGGATCCTAATAACTGC
4703 TATTTGCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGGAGCTCGGTACCCGGTTACGCCCCGCCCTGCCA
4764 ATCAGTACCAGGTCCGTGATTGTCAATTAATCCTCCAGATAAAAAAACGGGGCCAAAAGGCCCGGTAGTGTACAACAGTCGTTAGCGAACGTGGAGCACT
4765 TTAACCGGCCAAAAATCGGCAACATCAAAATACAACCTTAATTAACAGCGCATAACATGTTAAGTCTTTTTGAAAACAA
4766 ATGTTTCATCTCGATACTTTAGCAACGCTTGTTCGCCGAACGCTGACGTTGACGGGGAGTCAGGCAACT
4767 TTAGCTGAACAGAGAGTAGAAGATTGCGGAGATTGCAATCAGACCCATCAACATGTTAAGTCTTTTTGAAAACAA
4768 ATGGAAACGACTCAAACCAGCACGATTGCGTCGAAAAGACTCTCGTAGTGCGACGGGGAGTCAGGCAACT
4839 CGCCGGAGACGCCGAAGCAATCGCCGCCACATCAACGCCCTCTTCCAGCGCCACCAGCAGTTCTTTTAGCACGTACAATACGGGCTTTTTTTAATATGTCCC
4840 GCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTTCTCCCATGAAGACGGTGC GGCTTTTTTTAATATGTCCC
4841 TGTTTCATGCCGGATGCCGCTAATGTAGATCGCTGAACTTGTAGGCCCTGATAAGCGCAGCGTATCAGGCAATTTTTATAATGTTAGCGAACGTGGAGCACT
4842 TCAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGAGTTAGCGAACGTGGAGCACT
4843 CGCCACGCTGAAAAATCCATCAAAAAACCAGGCTTGAGTATAGCCTGGTTTTCGTTTTGATTGGCTGTGGTTTTTATACAGTCAGCGGCTTTTTTTAATATGTCCC
5252 TACAAATGCGTAAAAATCACCAGTGTGTAAACGATTCCACTAATTTATTACCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
5253 TGGTGGAGGTTTGAGCAGGGCAATGGCGCGTAGGCCCGATAAGCTTGCGTCCATCTGGTATCACTTAAAGG
5254 CGAACCCTGAATGAACAAGG
5255 CCCGCTGCTTTTGCTTCGC
5256 AAGCCAGATGATTTGTAATCATT
5257 TGAATTCAGAGTTGCGATTTTG
5258 ATCCGCGCCCTCTTCCAGCGCCACCAGCAACTCTTTTCGCGCGAACGATAACCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
5259 CTCCAGAGAAATAAAAAACGGGGCCGTTTGGCCCCGGTAGTGTACAACACCATCTGGTATCACTTAAAGG
5260 CGCGACCGTCGCAATATCG
5262 CGCCGGGAAGACGCGG
5263 ATCAGCACCAGGTCCGTGAT

5264 CTTTAAATAAGAATATTCAGCTTGTGTAAACGATACCACTTATCCAGACTCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
5265 GCCCGTTGGCTGACCAATTGCGTTCTACCATAGCGGAAAAACGGCGCACTGCCATCTGGTATCACTTAAAGG
5266 GTCTCCGATCGCCAAATGG
5267 CTGATCCAGCTCATCCAGC
5268 TAAACCTGTTTTTTAGCGATGC
5269 TGATGTTTCTGAGATAATGGAAAC
5270 GTCAACGCCGTGATCCAGCGCCACCAGCAGCTCTTTGGCCCTGACCACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
5271 CTTCCCTTACTGATTAAAGCCGGGCGTGAGTCACGCGACCACAATCTGAACCATCTGGTATCACTTAAAGG
5272 AGTGCAGCGGTTTCGATATCG
5273 GCTCTGTATCTGTGGATACG
5274 CGTCGGTGTGCTGGCGGC
5275 GCGATGACGATGTCGGTCAA
5276 CAGCGTCGAGTGAAAAACCCTGGAGTGTAACGATTCCACTAATTTATTCCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
5277 CGGTGGGGATTTGAGCGGTTCTACTGTGATAAAACAAGCAACAGGCCCGATCCATCTGGTATCACTTAAAGG
5278 GATAAACGTACCGCGGATGC
5280 TAACATAATGATTTATAATAAATTAAC
5281 TGA ACTCAAGGTTGCGATTTTG
5282 ATCCACACCGTCTTCCAGCGCCACCAGCAGCTCTTTAGCACGCACGATAACCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
5283 CTCAACCCCTCTAAATAGAAAAACCGGGGGCAAGCCCCCGGTGATGTACACCATCTGGTATCACTTAAAGG
5284 GATAACATCACCTACACGAGG
5285 ATCCAGAACAGATACAAACCC
5286 AGCCGGAGAGGCAGAGGC
5287 ACCAGCACCAGGTCCGTGA
5301 CTTACGGTCGTGGTTACACC
5376 ACACCTAATAGAACAGGTGAAAC
5377 AACGGGGGGTTTCGTGCACAC

Приложение 2. Конструирование штаммов, использованных в работе

Название штамма	Генотип	Предок
B928	Получен в результате внесения мутации <i>galK^{Tyr145UAG}</i> в геном MG1655. Мутация была получена путём трансформации клеток олигонуклеотидом 2250 с последующим скринингом на тетразолиевом агаре с галактозой по признаку неспособности к утилизации D-галактозы.	MG1655
B1270	Получен в результате лизогенизации MG1655 фагом λ <i>cI⁸⁵⁷</i>	MG1655
B1293	Получен в результате делеции области <i>cro-attR</i> внутри профага λ <i>cI⁸⁵⁷</i> кассетой <i>cat-sacB</i> , амплифицированной по праймерам 2847 и 2848 с pICA.	B1270
B1310	Получен в результате удаления кассеты <i>cat-sacB</i> из профага λ <i>cI⁸⁵⁷</i> путём трансформации клеток олигонуклеотидом 2282	B1293
B1411	Получен в результате интеграции кассеты <i>galK::cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 3093 и 3094 с pACYC184	MG1655
B1415	Получен в результате интеграции кассеты <i>lacZ::cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 3234 и 3235 с pACYC184	MG1655
B1733	Получен в результате внесения мутации <i>rpsL^{K43R}</i> путём трансформации клеток олигонуклеотидом 2811. Рекомбинантов отбирали по устойчивости к стрептомицину	MG1655
B1820	Получен в результате интеграции кассеты <i>galETKM::cat-sacB</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4027 и 4028 с pICA	MG1655
B1821	Получен в результате интеграции кассеты <i>lacZYA::cat-sacB</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4029 и 4030 с pICA	MG1655
B1822	Получен в результате интеграции кассеты <i>araBAD::cat-sacB</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4031 и 4032 с pICA	MG1655
B1823	Получен в результате интеграции кассеты <i>galETKM::rpsL-cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4027 и 4028 с pPRC	B1733
B1824	Получен в результате интеграции кассеты <i>lacZYA::rpsL-cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4029 и 4030 с pPRC	B1733
B1825	Получен в результате интеграции кассеты <i>araBAD::rpsL-cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4031 и 4032 с pICA	B1733
B1826	Получен в результате интеграции кассеты <i>galETKM::cI-hok-strA</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4111 и 4112 с pTmpSm	MG1655
B1827	Получен в результате интеграции кассеты <i>lacZYA::cI-hok-neo</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4113 и 4114 с pTmpKm	MG1655
B1828	Получен в результате интеграции кассеты <i>lacZYA::cI-hok^{L13UAA}-neo</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4113 и 4114 с pTmpKmHokL13Ochre	MG1655
B1829	Получен в результате интеграции кассеты <i>araBAD::cI-hok-aacC4</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4117 и 4118 с pTmpGm	MG1655
B1995	Получен в результате замены кассеты <i>lacZYA::cI-hok-neo</i> фрагментом, содержащим оперон <i>vioABCDE</i> . Фрагмент был амплифицирован по праймерам 4418 и 4419 с хромосомы <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532	B1827
B2000	Получен в результате замены кассеты <i>araBAD::cI-hok-aacC4</i> фрагментом, содержащим оперон <i>luxCDABCE</i> . Фрагмент был амплифицирован по праймерам 4510 и 4511 pDEW201	B1829
B2095	Получен в результате интеграции кассеты <i>araC::P_{H207in}-cI-hok-neo</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4631 и 4632 с pTmpKmH207in	B2000
B2096	Получен в результате интеграции кассеты <i>araC::P_{A104}-cI-hok-neo</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4631 и 4632 с pTmpKmA104in	B2000

B2099	Получен в результате удаления кассеты P _{H207} - <i>cl-hok-neo</i> таким образом, что промотор H207 из состава оказывался непосредственно перед опероном <i>luxCDABE</i> . Кассета была удалена путём трансформации клеток олигонуклеотидом 4634 с последующей <i>cl-hok</i> -контрселекцией рекомбинантов	B2095
B2100	Получен в результате удаления кассеты P _{A104} - <i>cl-hok-neo</i> таким образом, что промотор A104 из состава оказывался непосредственно перед опероном <i>luxCDABE</i> . Кассета была удалена путём трансформации клеток олигонуклеотидом 4635 с последующей <i>cl-hok</i> -контрселекцией рекомбинантов	B2096
B2108	Получен в результате удаления кассеты P _{A104} - <i>cl-hok-neo</i> путём трансформации клеток олигонуклеотидом 4679 с последующей <i>cl-hok</i> -контрселекцией рекомбинантов. В результате рекомбинации с олигонуклеотидом в область старта транскрипции A104 был интегрирован дополнительный <i>lac</i> -оператор, а полученный промотор P _{AlacO-1} был помещён непосредственно перед <i>luxCDABE</i> .	B2096
B2130	Получен в результате интеграции кассеты P _{H207in} - <i>cl-hok-neo</i> выше конструкции P _{AlacO-1} - <i>luxCDABE</i> . Кассета была амплифицирована 4690 и 4691 с pTmpKmH207in	B2108
B2131	Получен в результате интеграции <i>lacI</i> между P _{H207in} и конструкцией P _{AlacO-1} - <i>luxCDABE</i> . Фрагмент, содержащий <i>lacI</i> , был амплифицирован по праймерам 4692 и 4693 с хромосомы MG1655	B2130
B2137	Получен в результате интеграции модуля <i>ocr-γβexo-P_L-cat</i> между P _{AlacO-1} и <i>luxCDABE</i> . Фрагмент, содержащий <i>ocr-γβexo-P_L-cat</i> , был амплифицирован по праймерам 4702 и 4703 с pRedCmOcr	B2131
B2140	Получен в результате трансдукции мутации <i>ΔgalETKM::cl-hok-strA</i> из B1826 в B2137	B2137
B2141	Получен в результате трансдукции мутации <i>ΔlacZYA::cl-hok-neo</i> из B1827 в B2137	B2137
B2158	Получен в результате интеграции кассеты <i>manXYZ::cl-hok-neo</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4362 и 4363 с pTmpKm	MG1655
B2163	Получен в результате трансдукции мутации <i>ΔmanXYZ::cl-hok-neo</i> из B2158 в B2137	B2137
B2211	Получен в результате интеграции кассеты <i>sdaC::cl-hok-neo</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4767 и 4768 с pTmpKmH207in	B2137
B2212	Получен в результате интеграции кассеты <i>sdaC::cl-hok-neo</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4765 и 4766 с pTmpKmH207in	B2137
B2229	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-neo</i> в <i>lac</i> -локусе опероном <i>scrKYABR</i> . Кассета <i>lac::scrKYABR</i> была амплифицирована по праймерам 4840 и 4841 с плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-пусA-scrKYABR-gdhA	B1827
B1993	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-strA</i> в <i>gal</i> -локусе опероном <i>scrKYABR</i> . Кассета <i>gal::scrKYABR</i> была амплифицирована по праймерам 4416 и 4417 с плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-пусA-scrKYABR-gdhA	B1826
B2231	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-aacC4</i> в <i>ara</i> -локусе опероном <i>scrKYABR</i> . Кассета <i>ara::scrKYABR</i> была амплифицирована по праймерам 4842 и 4843 с плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-пусA-scrKYABR-gdhA	B2000
B2232	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-neo</i> в <i>man</i> -локусе опероном <i>scrKYABR</i> . Кассета <i>man::scrKYABR</i> была амплифицирована по праймерам 4764 и 4839 с плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-пусA-scrKYABR-gdhA	B2158
B2138	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-strA</i> в <i>gal</i> -локусе опероном <i>scrKYABR</i> . Кассета <i>gal::scrKYABR</i> была амплифицирована по праймерам 4416 и 4417 с плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-пусA-scrKYABR-gdhA	B2140
B2193	Получен в результате замены кассеты <i>lacZYA::cl-hok-neo</i> фрагментом, содержащим оперон <i>vioABCDE</i> . Фрагмент был получен путём обработки плазмиды pBR-vioABCDE эндонуклеазами рестрикции PdmI и BstI 107I с последующей обработкой щелочной фосфатазой FastAp	B2141
B2230	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-neo</i> в <i>lac</i> -локусе опероном <i>scrKYABR</i> . Кассета <i>lac::scrKYABR</i> была амплифицирована по праймерам 4840 и 4841 с плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-пусA-scrKYABR-gdhA	B2141
B2233	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-neo</i> в <i>man</i> -локусе опероном <i>scrKYABR</i> . Кассета <i>man::scrKYABR</i> была амплифицирована по праймерам 4764 и 4839 с плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-пусA-scrKYABR-gdhA	B2158

B2234	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-neo</i> в локусе <i>sdaC</i> конструкцией <i>pntAB-gdhA</i> . Фрагмент, содержащий <i>pntAB-gdhA</i> был получен путём обработки плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-русA-scrKYABR-gdhA эндонуклеазами рестрикции Eam1105I и PscI с последующей обработкой ДНК-полимеразой фага T4	B2211
B2235	Получен в результате замены кассеты <i>cl-hok-neo</i> в локусе <i>gltS</i> конструкцией <i>pntAB-gdhA</i> . Фрагмент, содержащий <i>pntAB-gdhA</i> был получен путём обработки плазмиды pMW-pntAB-aspC-asd-русA-scrKYABR-gdhA эндонуклеазами рестрикции Eam1105I и PscI с последующей обработкой ДНК-полимеразой фага T4	B2212