

Сравнительный анализ способов выделения геномной ДНК из клеток бактерий рода *Bacillus*

Научный руководитель – Микулинская Галина Викторовна

Цветкова Диана Владимировна

Студент (магистр)

Пушчинский государственный естественно-научный институт, Московская область, Россия

E-mail: dianatzvetckova@yandex.ru

Бактерии рода *Bacillus* широко применяются в биотехнологии как источник новых генов и рекомбинантных белков. Выделение ДНК и белков из цитоплазмы требует разрушения клеточной стенки. Клеточная стенка грамположительных бактерий отличается толщиной (70-80 нм) и прочностью, поэтому ее разрушение является лимитирующей стадией в экстракции цитоплазматических макромолекул [1].

В данной работе мы провели сравнительный анализ качества и количества геномной ДНК, выделенной из клеток *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. cereus* с помощью различных методов. Среди них были известные методы - физико-химический, химический [2], химико-ферментативный с протеиназой К [3], - и новые варианты гидролиза ферментами, специфически разрушающими пептидогликан - основной компонент клеточной стенки. Для специфического гидролиза мы использовали как яичную мурамидазу (HEWL) [4], так и пептидазы колифагов RB43 и RB49 (EndoRB49 и EndoRB43) [5], а также коктейль ферментов разной специфичности HEWL/EndoRB49. Гомогенные рекомбинантные ферменты EndoRB49 и EndoRB43, разрушающие связь между l-аланином и d-глутаматом бактериального пептидогликана, получали с помощью продукции в клетках *E. coli* C41(DE3) и дальнейшей хроматографической очистки.

Качество всех образцов геномной ДНК было высоким: они полностью гидролизовались рестриктазами, имели размер >23 т.п.н., а также служили эффективной матрицей для ПЦР с праймерами к гену 16S РНК. Однако, выход геномной ДНК сильно отличался. Наименее эффективными методами оказались физико-химический (3.8 мкг/мкл) и химический (14.9 мкг/мкл). Наибольшее количество ДНК из клеток *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* было получено методом специфического гидролиза с помощью HEWL (256.5 мкг/мл ночной культуры), EndoRB49 (245.4 мкг/мл) и их коктейля (311.4 мкг/мл). Следует отметить, что клетки *B. cereus* не подвержены ферментативному гидролизу; в их случае наиболее эффективными методами выделения ДНК являются те, в которых присутствует детергент.

HEWL, EndoRB49 и их коктейль оказались эффективны также при выделении клеточных белков, увеличивая их выход до 85% по сравнению с ультразвуковым разрушением.

Список литературы

1. Wenjing Cui and all. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond // World Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2018. - №34:145. - P. 1-19
2. Bollet C. at all. A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria // Nucleic Acids Research. - 1995. - Vol. 19, № 8
3. Wilso K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria // Current Protocols in Molecular Biology - 1997. - 2.4.1-2.4.5
4. Marmur J. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms // J. Mol. Biol. - 1961. - № 3, - P. 208-218

5. Mikoulinskaia et al., Two novel thermally resistant endolysins encoded by pseudo T-even bacteriophages RB43 and RB49 // Journal of General Virology - 2018. - DOI 10.1099/jgv.0.001014