

2  
НОМЕР

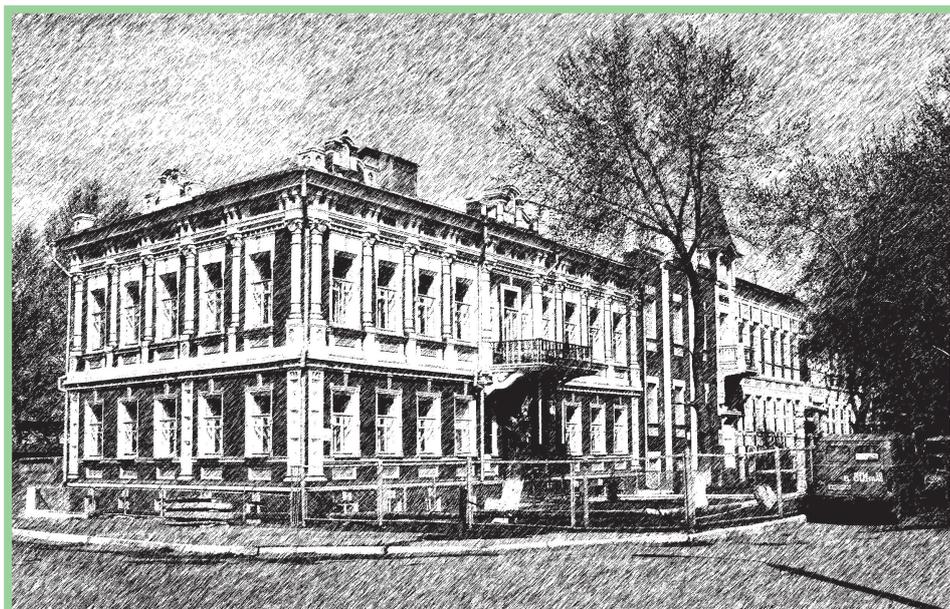


ISSN 2304-9081

Электронный журнал  
On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2016

**УЧРЕДИТЕЛИ**

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН  
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК 579.852.11:616-078

Д.К. Благова<sup>1</sup>, А.Х. Баймиев<sup>1,2</sup>, А.С. Симахина<sup>2</sup>, А.Р. Мавзютов<sup>2</sup>

## ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕНОГО ЗЕЛЕНЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 3H

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики микроорганизмов УНЦ РАН, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

*Цель.* Создание флуоресцентно меченой конструкции штамма *Bacillus subtilis* 3H.

*Материалы и методы.* Для создания флуоресцентно меченой конструкции на основе штамма *Bacillus subtilis* 3H использовали плазмиду pDG1662, в которую был встроены ген *turbogfp* флуоресцентного белка TurboGFP.

*Результаты.* После трансформации клеток *Bacillus subtilis* 3H по наличию зеленого флуоресцентного свечения бактерий были отобраны рекомбинантные клоны, несущие указанный ген. Рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* 3H, несущий ген *gfp*, нарабатывали зеленый флуоресцентный белок, однако интенсивность свечения при этом была существенно ниже, нежели свечение рекомбинантных клонов *E.coli*, экспрессирующих данный ген.

*Ключевые слова:* пробиотики, *Bacillus subtilis* 3H, *E.coli*, флуоресцентный белок GFP, генно-инженерная конструкция, плазида pDG1662.

---

---

D.K. Blagova<sup>1</sup>, A.H. Baymiev<sup>1,2</sup>, A.S. Simakhina<sup>2</sup>, A.R. Mavzyutov<sup>2</sup>

## RECEIVING OF THE PROBIOTIC STRAIN *BACILLUS SUBTILIS* 3H LABELLED BY THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics USC, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

*Objective.* Creating the design of fluorescently labeled strain *Bacillus subtilis* 3H.

*Materials and Methods.* To create fluorescently labeled structures based on strain *Bacillus subtilis* 3H plasmid pDG1662, which gene *turbogfp* TurboGFP fluorescent protein was inserted.

*Results.* After transformation of *Bacillus subtilis* 3H cells by the presence of green fluorescence emission bacteria were selected recombinant clones carrying the gene. Recombinant clones strain *Bacillus subtilis* 3H, carrying the *gfp* gene, the green fluorescent protein is accumulating, but the luminescence intensity was thus significantly lower than the glow recombinant *E.coli* clones expressing said trait.

*Keywords:* probiotics, *Bacillus subtilis* 3H, *E.coli*, the GFP fluorescent protein, genetic engineering construction, plasmid pDG1662.

## Введение

В последние годы отмечается радикальный пересмотр роли микроорганизмов в обеспечении жизнедеятельности человека. Все чаще систему «микробиота-человек» рассматривают в качестве новой гармонизированной формы существования живых организмов, именуемой «суперорганизм», поскольку целый ряд описанных для данной системы связей реализуется на ме-

таболическом уровне [1]. Например, показаны корреляции между изменениями микробиоты кишечника человека, продуктами микробного происхождения и уровнем экспрессии генов, определяющих синтез гормонов в организме хозяина [2].

Указанное обстоятельство обозначило целый ряд новых методических задач, без решения которых, существенно снижаются темпы получения новых научных данных о поведении бактерий в сложных модельных системах, например, таких, как желудочно-кишечный тракт [3]. К числу подобных задач можно отнести необходимость флуоресцентного маркирования штаммов посредством клонирования соответствующих генов, обеспечивающих витальную экспрессию флуорофоров, что позволит исследовать *in vivo* как закономерности колонизации кишечника [4], так и особенности симбиотических взаимоотношений в окружающей среде, например, почвенных микроорганизмов, имеющих сельскохозяйственное значение [5].

Вместе с тем перечень флуоресцентных белков, применимых для прижизненного маркирования микроорганизмов относительно невелик, поскольку для их практического использования они должны соответствовать ряду критериев. В частности, интенсивность их свечения должна превышать уровень исходной аутофлуоресценции клетки. Флуорохромный белок должен быть фотостабильным, что позволит обнаруживать его в течение длительного периода. И, наконец, флуоресцентный белок не должен быть токсичным для экспрессирующей его клетки [6]. Одним из первых белков, который соответствовал всем перечисленным требованиям, был зеленый флуоресцентный белок экворин (GFP, в присутствии ионов Са - голубой), выделенный из медузы *Aequorea victoria* [7]. Ген GFP впервые был клонирован в 1992 году [8], а впоследствии эффективно экспрессировался как в прокариотических, так и эукариотических клетках [9, 10]. В настоящее время флуоресцентный белок GFP в качестве биосенсора успешно применялся на широком круге хозяев для установления внутриклеточной локализации и динамики белков, при изучении механизмов экспрессии и межмолекулярных взаимодействий [11-13].

Одним из общепризнанно безопасных и наиболее биотехнологически популярных биологических объектов в последние годы становится *Bacillus subtilis*. Это связано с доказанной возможностью получения при использовании указанных бактерий различных ферментов и сверхэкспрессии целого ря-

да рекомбинантных белков, представляющих интерес для фармацевтики и промышленности, таких как амилаза [14-17], липаза [18], щелочная полигалактоуронатлиаза [19]. Кроме того *B. subtilis* формирует культуры очень высокой плотности, а продуцируемые субстраты выделяются в культуральную жидкость, из которой они могут быть выделены и очищены. Несмотря на это, до настоящего времени надежные способы маркирования *B. subtilis* не разработаны.

В связи с этим цель настоящего исследования состояла в получении пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 3Н, флуоресцентно меченного флуоресцентным белком TurboGFP из медузы *Aequorea victoria*.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования являлся штамм *B. subtilis* 3Н, используемый в пробиотических препаратах.

В работе использовали гены флуоресцентных белков TurboGFP (максимумы возбуждения/испускания – 482/502 нм) – улучшенный вариант белка CopGFP из копеподы *Pontellina plumata* [20]. Источником гена этого белка послужил коммерческий вектор pTurboGFP-B (“Evrogen”, Россия).

В качестве основы для создания генно-инженерной конструкции с геном флуоресцентного белка для трансформации клеток *Bacillus* sp., использовали плазмиду pDG1662 [22].

Трансформацию бактериальных клеток проводили методом, описанным Yasbin с соавторами [23]. Поиск рекомбинантных клонов проводили методом выявления зеленого флуоресцентного свечения клеток бактерий при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 (“Carl Zeiss”, Германия).

### **Результаты и обсуждение**

При создании генно-инженерной конструкции для маркирования зеленым флуоресцентным белком *B. subtilis* 3Н была использована плазида pDG1662 [24], которую расщепили эндонуклеазами по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI, что привело к выщеплению фрагмента ДНК, содержащего ген устойчивости к антибиотику хлорамфениколу *cat* (рис. 1).

На место выщепленного фрагмента плазмиды pDG1662 был встроен ген *turbogfp*. Следующим этапом полученная конструкция была переведена в линейную форму за счет расщепления его по сайту рестрикции XhoI (рис.1).

Данный этап был необходим для введения полученной конструкции в клетки *B. subtilis* 3H по механизму естественной трансформации. За счет фланкирования целевого гена последовательностями, соответствующими начальному и конечному участкам гена амилазы (AmyE), целевой фрагмент ДНК имеет возможность по механизму эктопической рекомбинации встроиться в бактериальную хромосому в состав гена амилазы.

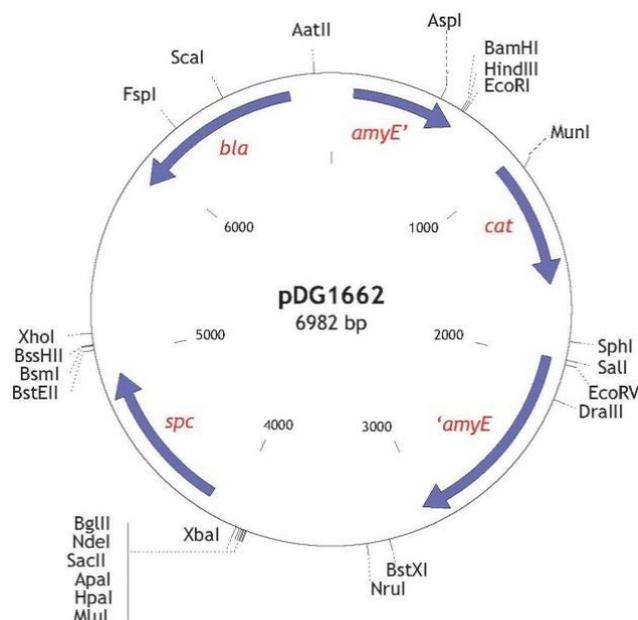


Рис. 1. Схематическое изображение плазмидного вектора pDG1662.

Скрининг рекомбинантных клонов *B. subtilis* 3H, несущих ген зеленого флуоресцентного белка, после процедуры по трансформации осуществляли по наличию зеленого флуоресцентного свечения бактерий.

В результате проведенных экспериментов были получены рекомбинантные клоны *B. subtilis* 3H, имеющие зеленое флуоресцентное свечение. Однако сравнительное исследование интенсивности свечения рекомбинантных клонов *B. subtilis* 3H и клеток *E. coli*, несущих тот же ген под управлением промотора фага T5 было отмечено, что у рекомбинантных *B. subtilis* 3H интенсивность свечения была существенно ниже (рис. 2). Причиной этого может являться недостаточная сила промотора фага T5 *E. coli* в клетках *B. subtilis*, под управлением которого в бактерии был введен ген gfp.

Наиболее часто используемыми системами экспрессии в *B. subtilis* являются системы индуцируемой экспрессии, включающие индуктор-специфичные промоторы, например, такие как промотор фага T7; промотор *grac*; индуцируемый изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом промотор *spac*; индуцируемый ксилозой промотор *xylA*; индуцируемый сахарозой - *SacB* и

крахмалом – промотор  $\alpha$ -амилазы, [17, 25, 26].

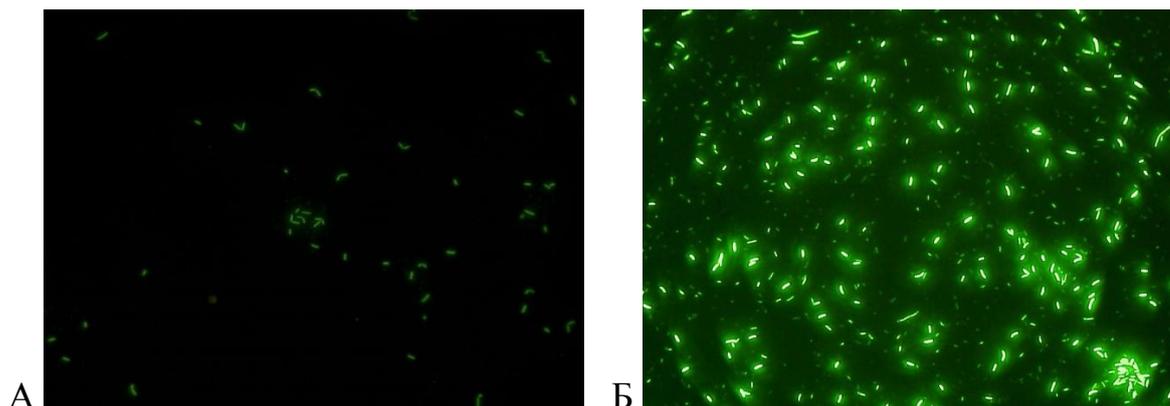


Рис. 2. Клетки *Bacillus subtilis* 3H (А) и *E.coli* (Б) маркированные зеленым флуоресцентным белком. Снимки сделаны при одинаковой интенсивности возбуждающего облучения.

Указанные системы обеспечивали приемлемый уровень экспрессии клетками *B. subtilis* как гомологичных, так и гетерологичных белков, однако, отмечается, что для этого необходим изначально высокий уровень экспрессируемых белков, а кроме того – избыточное содержание индуктора в культуральной среде, исключающее вероятность снижения его концентрации в результате естественной ферментации. Недавно предложены субтилин-регулируемая (SURE) и LiaRS-контролируемая (LIKE) системы экспрессии *B. subtilis* [27. 28].

### **Заключение**

В последние годы появились достаточно интересные данные, свидетельствующие о том, что интенсивность экспрессии белков, в частности рекомбинантными клонами *B. subtilis*, определяется не только генетическими механизмами, обусловленными, например, типом промоторов, но может во многом определяться наряду с типом индукторов и рядом других факторов. При этом эффекты индуктора не всегда сводятся к классическим субстрат-зависимым механизмам. Так, совсем недавно удалось сконструировать на основе плазмиды систему, включающую промотор *srf* оперона и экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок. Однако было показано, что интенсивность экспрессии флуоресцентного белка определялась плотностью бактериальных клеток, была минимальной в раннюю экспоненциальную фазу и наоборот максимальной – в позднюю экспоненциальную фазу роста. При этом глюкоза если и влияла на интенсивность экспрессии данного белка, то только опосредованно, через изменение концентрации бактерий в культуре [29].

Указанная особенность, расширяя возможности флуоресцентного маркирования *B. subtilis*, вместе с тем формирует целый пул новых вопросов, касающийся возможности использования флуоресцентно-маркированных культур для изучения их экологии в богатых питательными веществами средах или в условиях *in vivo*, когда среда обитания микроорганизмов может изменяться под влиянием целого ряда неконтролируемых факторов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. Nature publishing group: *Mucosal Immunology*; online publication 5 May 2010. doi: 10.1038/mi.2010.20.
2. Neuman H., Debelius J.W., Knight R., Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiology Reviews*; Advance Access published February 19, 2015. doi: 10.1093/femsre/fuu010.
3. Marco M.L., Pavan S., Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion Biotechnology*. 2006. 17: 204-210.
4. van Zyl W.F., Deane S.M., Dicks L.M.T. Use of the mCherry fluorescent protein to study intestinal colonization by *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 in mice. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. 81: 5993-6002.
5. Баймиев А.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченных штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro*. Молекулярная биология. 2011. 45(6): 684-991.
6. Kilaru S., Schuster M., Studholme D., Soanes D., Lin C., Talbot N.J. et al. A codon-optimized green fluorescent protein for live cell imaging in *Zyoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*. 2015: 79125-79131.
7. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1962. 59: 223-239.
8. Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormie, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 1992. 111: 229-233.
9. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994. 263: 802-805.
10. Inouye S., Tsuji F.I. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*. 1994. 341: 277-280.
11. Garamszegi N., Garamszegi Z.P., Rogers M.S., DeMarco S.J., Strehler E.E. Application of a chimeric green fluorescent protein to study protein-protein interactions. *Biotechniques*. 1997. 23: 864-872.
12. Kahana J.A., Silver P.A., Use of the *A.victoria* green fluorescent protein to study protein dynamics *in vivo*. In: Ausubel, Frederick M., et al. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (Chapter 9: Unit9 7C), 2001.
13. Voss U., Larriue A., Wells D.M. From jellyfish to biosensors: the use of fluorescent proteins in plants. *International Journal of Developmental Biology*. 2013. 57: 525-533.
14. Chen J., Gai Y., Fu G., Zhou W., Zhang D., Wen J. Enhanced extracellular production of alpha-amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of PrsA lipoprotein. *Biotechnology Letters*. 2015. 37(4): 899-906.
15. Rabbani M., Mirmohammad Sadeghi H., Moazen F., Rahimi M., Salehi G. Cloning and expression of randomly mutated *Bacillus subtilis* alpha-amylase genes in HB101. *Biotechnology Research International*. 2011. doi:10.4061/2011/305956.
16. Yang H., Liu L., Li J., Du G., Chen J. Heterologous expression, biochemical characteriza-

- tion, and overproduction of alkaline alpha-amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 2011. 10: 77.
17. Ying Q., Zhang C., Guo F., Wang S., Bie X., Lu F. et al. Secreted expression of a hyperthermophilic alpha-amylase gene from *Thermococcus sp.* HJ21 in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2012. 22(6): 392-398.
  18. Lu Y., Lin Q., Wang J., Wu Y., Bao W., Lv F. et al. Overexpression and characterization in *Bacillus subtilis* of a positionally nonspecific lipase from *Proteus vulgaris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010. 37(9): 919-925.
  19. Zhang J., Kang Z., Ling Z., Cao W., Liu L., Wang M. et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements. *Bioresource Technology*. 2013; 146: 543–548.
  20. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A. et al. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Molecular Biology and Evolution*. 2004; 21: 841-850
  21. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods*. 2007; 4: 555-557.
  22. Newman J.R., Fuqua C. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene*. 1999. 227: 197-203.
  23. Yasbin, R. E., Wilson G. A., Young F.E. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: Evidence for selective induction of prophage in competent cells. *Journal of Bacteriology*. 1975; 121: 296-304.
  24. Guerout-Fleury A.M., Frandsen N., Stragier P. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1996; 180(1-2): 57-61.
  25. Chen P.T., Shaw J.F., Chao Y.P., David Ho T.H., Yu S.M. Construction of chromosomally located T7 expression system for production of heterologous secreted proteins in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(9):5392–5399.
  26. Wieland K.P., Wieland B., Gotz F. A promoter-screening plasmid and xyloseinducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*. *Gene*. 1995; 158(1): 91–96.
  27. Bongers RS, Veening JW, Van Wieringen M, Kuipers OP, Kleerebezem M. Development and characterization of a subtilin-regulated expression system in *Bacillus subtilis*: strict control of gene expression by addition of subtilin. *Applied Environmental Microbiology*. 2005; 71(12): 8818-8824.
  28. Toymentseva AA, Schrecke K, Sharipova MR, Mascher T. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the *liaI* promoter. *Microbial Cell Factories*. 2012; 11: 143
  29. Guan C., Cui W., Cheng J., Zhou L., Guo J., Hu X. et al. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 2015; 14: 150. DOI 10.1186/s12934-015-0341-2

Поступила 12.05.2016

*(Контактная информация:*

**Благова Дарья Константиновна** – к.б.н., научный сотрудник Института биохимии и генетики УНЦ РАН; адрес: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, тел./факс 8 (347) 2356088, e-mail: blagova\_darya@mail.ru;

**Баймиев Андрей Ханифович** – д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биохимии и генетики УНЦ РАН; адрес: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, тел./факс 8 (347) 2356088, e-mail: baumiev@anrb.ru; профессор кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России; адрес: 450077, г. Уфа, ул. Ленина, 3, тел./факс 8 (347) 272-41-73;

**Симахина Аделия Сергеевна** – студент медико-профилактического факультета с

отделением микробиологии БГМУ Минздрава России; адрес: 450077, г. Уфа, ул. Ленина, 3, тел./факс 8 (347) 272-41-73, e-mail: adel-ru@mail.ru;

**Мавзютов Айрат Радикович** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ Минздрава России; адрес: 450077, г. Уфа, ул. Ленина, 3, тел./факс 8 (347) 272-41-73, e-mail: ufalab@mail.ru)

---

---

## LITERATURA

1. Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. Nature publishing group: *Mucosal Immunology*; online publication 5 May 2010. doi: 10.1038/mi.2010.20.
2. Neuman H., Debelius J.W., Knight R., Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiology Reviews*; Advance Access published February 19, 2015. doi: 10.1093/femsre/fuu010.
3. Marco M.L., Pavan S., Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion Biotechnology*. 2006. 17: 204-210.
4. van Zyl W.F., Deane S.M., Dicks L.M.T. Use of the mCherry fluorescent protein to study intestinal colonization by *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 in mice. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. 81: 5993-6002.
5. Baymiyev An.KH., YAmidanov R.S., Matniyazov R.T., Blagova D.K., Baymiyev Al.KH., CHemeris A.V. Preparation of fluorescently labeled wild strains of nodule bacteria of leguminous for their detection in vivo and in vitro. *Molekulyarnaya biologiya*. 2011. 45(6): 684-991. (in Russian)
6. Kilaru S., Schuster M., Studholme D., Soanes D., Lin C., Talbot N.J. et al. A codon-optimized green fluorescent protein for live cell imaging in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*. 2015: 79125-79131.
7. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1962. 59: 223-239.
8. Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormie, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 1992. 111: 229-233.
9. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994. 263: 802-805.
10. Inouye S., Tsuji F.I. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*. 1994. 341: 277-280.
11. Garamszegi N., Garamszegi Z.P., Rogers M.S., DeMarco S.J., Strehler E.E. Application of a chimeric green fluorescent protein to study protein-protein interactions. *Biotechniques*. 1997. 23: 864-872.
12. Kahana J.A., Silver P.A., Use of the *A.victoria* green fluorescent protein to study protein dynamics in vivo. In: Ausubel, Frederick M., et al. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (Chapter 9: Unit9 7C), 2001.
13. Voss U., Larrieu A., Wells D.M. From jellyfish to biosensors: the use of fluorescent proteins in plants. *International Journal of Developmental Biology*. 2013. 57: 525-533.
14. Chen J., Gai Y., Fu G., Zhou W., Zhang D., Wen J. Enhanced extracellular production of alpha-amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and overexpression of PrsA lipoprotein. *Biotechnology Letters*. 2015. 37(4): 899-906.
15. Rabbani M., Mirmohammad Sadeghi H., Moazen F., Rahimi M., Salehi G. Cloning and expression of randomly mutated *Bacillus subtilis* alpha-amylase genes in HB101. *Biotechnology Research International*. 2011. doi:10.4061/2011/305956.
16. Yang H., Liu L., Li J., Du G., Chen J. Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline alpha-amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 2011. 10: 77.
17. Ying Q., Zhang C., Guo F., Wang S., Bie X., Lu F. et al. Secreted expression of a

- hyperthermophilic alpha-amylase gene from *Thermococcus sp.* HJ21 in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2012. 22(6): 392-398.
18. Lu Y., Lin Q., Wang J., Wu Y., Bao W., Lv F. et al. Overexpression and characterization in *Bacillus subtilis* of a positionally nonspecific lipase from *Proteus vulgaris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010. 37(9): 919-925.
  19. Zhang J., Kang Z., Ling Z., Cao W., Liu L., Wang M. et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements. *Bioresource Technology*. 2013; 146: 543–548.
  20. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A. et al. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Molecular Biology and Evolution*. 2004; 21: 841-850
  21. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods*. 2007; 4: 555-557.
  22. Newman J.R., Fuqua C. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene*. 1999. 227: 197-203.
  23. Yasbin, R. E., Wilson G. A., Young F.E. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: Evidence for selective induction of prophage in competent cells. *Journal of Bacteriology*. 1975; 121: 296-304.
  24. Guerout-Fleury A.M., Frandsen N., Stragier P. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1996; 180(1-2): 57-61.
  25. Chen P.T., Shaw J.F., Chao Y.P., David Ho T.H., Yu S.M. Construction of chromosomally located T7 expression system for production of heterologous secreted proteins in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(9):5392–5399.
  26. Wieland K.P., Wieland B., Gotz F. A promoter-screening plasmid and xyloseinducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*. *Gene*. 1995. 158(1): 91–96.
  27. Bongers RS, Veening JW, Van Wieringen M, Kuipers OP, Kleerebezem M. Development and characterization of a subtilin-regulated expression system in *Bacillus subtilis*: strict control of gene expression by addition of subtilin. *Applied Environmental Microbiology*. 2005. 71(12): 8818-8824.
  28. Toymentseva AA, Schrecke K, Sharipova MR, Mascher T. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the *lial* promoter. *Microbial Cell Factories*. 2012. 11: 143.
  29. Guan C., Cui W., Cheng J., Zhou L., Guo J., Hu X. et al. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 2015; 14: 150. DOI 10.1186/s12934-015-0341-2.

**Образец ссылки на статью:**

Благова Д.К., Баймиев А.Х., Симахина А.С., Мавзютов А.Р. Получение меченого зеленым флуоресцентным белком пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 3Н. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 9с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/BDK-2016-2.pdf>).