

УДК 579.852.11

КОНЬЮГАЦИОННАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ВЕКТОРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ В КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

© 2023 г. А. С. Гуринович¹, И. А. Федюшко¹, М. А. Титок¹, *

¹ Белорусский государственный университет, биологический факультет,
кафедра микробиологии, Минск, 220030 Республика Беларусь

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 03.05.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Разработана система доставки векторов для молекулярного клонирования в клетки бактерий рода *Bacillus*. Особенность созданной системы заключается в использовании плазмиды pBS72, обеспечивающей конъюгационный перенос полученного условно летального вектора pKS1mob в клетки исследуемых бактерий. Способность вектора pKS1mob реплицироваться в клетках *Escherichia coli* и *B. subtilis* при пониженной температуре (30°C), наличие двух полилинкеров вокруг гена канамицин-резистентности позволяет клонировать в его состав фрагменты целевых генов с использованием традиционных генно-инженерных подходов. Инактивация гена *rok* в плазмиде pBS72 позволила с высокой эффективностью трансформировать содержащий ее штамм сконструированным вектором pKS1mob. Скрещивание донорного штамма *B. subtilis* 168, содержащего конъюгативную pBS72 и мобилизуемую pKS1mob плазмиды, со штаммом-реципиентом рода *Bacillus* позволило ввести в него плазмиду pKS1mob. Показана возможность использования созданной системы для инактивации гена *codY* бактерий *Bacillus licheniformis*.

Ключевые слова: *B. subtilis*, плаزمида pBS72, Rok белок, вектор pKS1mob, конъюгационный перенос, компетентность

DOI: 10.31857/S0555109923060065, **EDN:** CVNJOP

Бактерии рода *Bacillus*, благодаря способности синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, широко используются в биотехнологии в качестве продуцентов ферментов, антибиотиков, стимуляторов роста растений и животных [1]. В связи с этим большой практический и научный интерес представляют исследования, направленные на изучение функциональной организации их геномов, а также отдельных генетических детерминант, определяющих практически важные свойства. Следует отметить, что для генетического анализа бактерий используются подходы, основанные на естественных процессах генетического обмена, в ходе которых генетический материал, попадая в клетку путем конъюгации, трансформации и трансдукции, встраивается в геном за счет гомологичной рекомбинации, либо наследуется вне хромосомы в составе мобильных генетических элементов. Эти широко распространенные в мире прокариот процессы обеспечивают появление новых комбинаций генов и быструю адаптацию микроорганизмов в изменяющихся условиях внешней среды. В лабораторных условиях для большинства бактерий тра-

диционно используется метод трансформации (электропорации), позволяющий вводить генно-инженерные конструкции для изучения функциональной организации генетического материала и создания штаммов с заданными свойствами. Однако, несмотря на наличие в геноме представителей рода *Bacillus* (например, *Bacillus subtilis*) генетической системы, обеспечивающей их природную компетентность, внесение в клетки этих бактерий чужеродной ДНК может быть затруднено, либо невозможно. Весьма показательным является пример коллекционного штамма *B. subtilis* 168, широко используемого для генетических и генно-инженерных исследований. Природные бактерии, на основе которых этот штамм был получен, содержали плазмиду pBS32, препятствующую трансформации [2]. Аналогичное наблюдали у природных бактерий *B. subtilis*, содержащих конъюгативную плазмиду pLS20 [3]. Сложности, возникающие при введении чужеродной ДНК путем трансформации (электропорации), наблюдали и для других биотехнологически значимых бактерий этой таксономической группы (например, природных бактерий *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amy-*

loliuefaciens, *B. pumilus* и др.) [4]. При этом в клетках многих из них присутствовали плазмиды, роль которых в подавлении процесса трансформации до сих пор не известна. В связи с этим, для введения генно-инженерных конструкций в клетки данных микроорганизмов пристальное внимание уделяется процессу конъюгации. В настоящее время показана возможность использования конъюгативного транспозона ICEBs1 и конъюгативной плазмиды pLS20 [4, 5]. Поскольку конъюгационные системы этих мобильных элементов подвержены негативной регуляции, было важно изучить возможность использования плазмиды pBS72, способной передаваться путем конъюгации и мобилизовать конъюгационный перенос векторных молекул вне зависимости от условий скрещивания (в частности, перенос не зависел от времени скрещивания и обеспечивался на плотной и в жидкой среде различного химического состава) [6].

Цель настоящей работы – создание системы конъюгационной переноса векторов в клетки бактерий рода *Bacillus* с использованием плазмиды pBS72.

МЕТОДИКА

В работе использовали штаммы *B. subtilis* 72 с плазмидой pBS72 [7], *B. subtilis* d16, *B. licheniformis* FD9, *B. velezensis* 71A3 из коллекции кафедры микробиологии Белорусского государственного университета (БГУ), коллекционные штаммы *B. subtilis* 168, содержащие маркированную геном эритромицинрезистентности плазмиду pBS72 и/или плазмиду pCB16 [8], *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* TG1 и фитопатогенные грибы *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria radicina* из коллекции кафедры ботаники БГУ, а также плазмиды pMTL21C и pKS1 [9]. Бактерии выращивали в полноценной среде LB [10] и минимальной среде [11] при 37°C с аэрацией (240 об./мин). Для роста фитопатогенных грибов использовали картофельно-морковный агар: картофель – 20 г/л, морковь – 20 г/л, агар – 15 г/л.

В работе использовали коммерческие препараты ампициллина (100 мкг/мл), хлорамфеникола (10 мкг/мл), эритромицина (10 мкг/мл), стрептомицина (50 мкг/мл), тетрациклина (25 мкг/мл), и канамицина (50 мкг/мл).

Тотальную ДНК выделяли саркозиевым методом [12]. Трансформацию бактерий *E. coli* и *B. subtilis* осуществляли согласно методам, приведенным в работах [10, 13].

Для амплификации использовали Phusion HF ДНК-полимеразу производства “ThermoScientific” (США) и праймеры производства ОДО “Праймтех” (Беларусь). Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,5 мкмоль/л каждого праймера,

0,02 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для амплификации фрагмента гена *rok* плазмиды pBS72 размером 421 п.н. использовали праймеры Frok-nok (5'-TCT CTC TCT ACC TGT TTT TGC AG-3') и Rrok-nok (5'-TGT GTCAAA TGC CAA ACG AC-3'), для амплификации *mobV*-сайта плазмиды pBC16 размером 1863 п.н. – праймеры Fmob (5'-GC GCG ATT GCT GAA TAA AAG ATA C-3') и Rmob (5'-CAC TTC AAC GCA CCT TTC AG-3'), для амплификации гена *Km^R* плазмиды pKS1 размером 1009 п.н. – праймеры FKmR (5'-CGGT CCG GAG TCG ATA CTA TGT TAT ACG CCA AC-3') и RKmR (5'-CGG TCC GGA CGG CAA TTG AGC TTT TTA GAC ATC TAA ATC TAG GTA C-3'), содержащие на 5'-концах сайт рестрикции для фермента Kpn2I.

Амплификацию фрагментов гена *codY* бактерий *B. licheniformis* FD9 размером 239 п.н. и 156 п.н. проводили соответственно с использованием праймеров F1codY (5'-CCG CGG CGG AAA CGT CAT CTA ACC TTG-3') и R1codY (5'-GAT CTC TTC CGC TTT CTC TCT GAT CCG GAG AAT TTC CAT TCC TAC GAC AGT G-3'), F2codY (5'-CGG TCC GGA TCA GAG AGA AAG CGG AAG AGA TC-3') и R2codY (5'-CAA TTT TAC TAG CGA CAA GCA GG-3'). Внутренние праймеры R1codY и F2codY содержали на 5'-концах сайт рестрикции для фермента Kpn2I. Полученные ПЦР-продукты использовали в качестве матрицы для амплификации гена *codY* размером 381 п.н. с внешними праймерами F1codY и R2codY, содержащими на 5'-концах сайты рестрикции для ферментов SacII и Eco147I соответственно.

Рестрикцию и лигирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем (“Thermo Scientific”, США). Все продукты ПЦР встраивали в вектор pMTL21C в уникальный *SmaI*-сайт. Последовательность *mobV*-сайта вырезали из плазмиды pMTL21C рестриктазами *KpnI* и *HindIII* с последующим встраиванием в плазмиду pKS1, предварительно обработанную этими же рестриктазами. В сайт *Kpn2I* гена *codY* встраивали маркер канамицинрезистентности, вырезанный из плазмиды pMTL21C с помощью этой же рестриктазы. Встраивание гена *codY*, маркированного канамицинрезистентностью, осуществляли между сайтами *SacII* и *Eco147I* вектора pKS1mob.

Интеграцию вектора pMTL21C, содержащего фрагмент гена *rok*, в состав плазмиды pBS72 устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймера M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3'), отжигающегося на последовательности вектора pMTL21C, и праймера Rrok-out (5'-GTT GGG TTA TCG ATA GCG AAG-3'), комплементарно связывающегося вне области встраивания гибридной плазмиды (был

получен фрагмент искомого размера 567 п.н.). Интеграцию гибридного вектора pKS1mob, содержащего фрагмент гена *codY*, в хромосому бактерий *B. licheniformis* FD9 устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймера FKmR (5'-CGG TCC GGA GTC GAT ACT ATG TTA TAC GCC AAC-3'), отжигающегося на последовательности вектора pKS1mob, и праймера FcodY-out (5'-GAA CAT TTT CGT CGT CAG CC-3'), комплементарно связывающегося вне области встраивания гибридной плазмиды. В результате был получен фрагмент искомого размера 1385 п.н.

Для определения частоты переноса конъюгативной плазмиды pBS72 в изогенной системе скрещивания культуру донора и реципиента в логарифмической фазе роста смешивали 1 : 1 и скрещивали в жидкой среде LB с аэрацией в течение 1, 2, 3, 4 или 24 ч с последующим высевом на селективные среды. Для определения частоты переноса мобилизуемого вектора в гетерогенных системах культуру донора и реципиента в логарифмической фазе роста разводили в 10 раз в свежей полноценной среде (800 мкл) с последующим культивированием с аэрацией в течение 3 или 24 ч при температуре 30°C. После 3 и 24 ч скрещивания клетки высевали на минимальную среду с канамицином и культивировали при 37°C. Полученные трансконъюганты проверяли на наличие маркеров антибиотикорезистентности методом реплик. Присутствие в клетках трансконъюгантов плазмид дополнительно определяли с использованием ПЦР-анализа.

Определение антифунгальной активности осуществляли методом посева 100 мкл взвеси конидий в концентрации (100 кон./мл) на поверхность подсушенной агаризованной питательной среды. После этого вырезали лунки диаметром 0.5 см, в которые вносили по 100 мкл жидкой культуры бактерий-антагонистов и культивировали при 28°C в течение 5 сут. Через 5 сут отмечали зону лизиса. В качестве контроля использовали питательный бульон, в котором выращивали штаммы-антагонисты. На основании трех независимых экспериментов с шестью повторами проводили статистическую обработку данных с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий была подтверждена однофакторным дисперсионным анализом.

Для анализа аминокислотных последовательностей белков Rok, кодируемых плазмидами pBS72 (APB62404) и pLS20 (BAJ76946.1), а также хромосомным геном бактерий *B. subtilis* 168 (NP_389307) использовали программу BLASTN2.10.0 (сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Аминокислотные последовательности гомологичных белков выравнивали с помощью программы "ClustalOmega"

(сайт <https://www.ebi.ac.uk/Tools/common/tools/help/index.html?tool=clustalo>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания системы конъюгационного переноса векторов с использованием плазмиды pBS72 необходимо было решить следующие задачи. Во-первых, определить возможность введения векторов в клетки коллекционных бактерий *B. subtilis* 168, содержащих маркированную плазмиду pBS72, и при отсутствии трансформации установить наличие в составе плазмидного репликона генов, ингибирующих данный процесс. Во-вторых, сконструировать вектор пригодный для молекулярного клонирования и способный передаваться путем конъюгации за счет плазмиды pBS72. Для этих целей предполагали использовать известный вектор pKS1, способный копироваться в клетках *E. coli*, отличительной особенностью которого являлась зависимость от температуры репликация. Он стабильно наследовался в бактериях разных систематических групп (*E. coli* и рода *Bacillus*) при температуре 30°C и утрачивался клетками при 37°C [9]. Это позволяло использовать данный репликон для введения чужеродного генетического материала при пониженной температуре и направленного мутагенеза при повышенной температуре культивирования. Для этого необходимо было клонировать в его состав *mobV*-сайт, обеспечивающий его конъюгационный перенос плазмидой pBS72. И, наконец, установить возможность использования созданной системы для генетического анализа бактерий рода *Bacillus*. Для этого предполагали встроить в состав созданного мобилизуемого вектора фрагменты бактериального гена *codY* природных бактерий *B. licheniformis* FD9. Поскольку известно, что данная детерминанта кодировала негативный регулятор синтеза антимицробных соединений (показана негативная регуляция синтеза лихенизина, определяющего антифунгальные свойства данных бактерий) [15], предполагали, что внесение направленной мутации в данный ген приведет к изменению антифунгальной активности исследуемых бактерий.

На первом этапе работы было установлено, что бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду pBS72 не трансформируются вектором pKS1. Отсутствие трансформантов свидетельствовало о присутствии в геноме плазмиды pBS72 детерминант, подавляющих поглощение чужеродной ДНК. Действительно, в результате анализа полной нуклеотидной последовательности плазмиды pBS72 была выявлена открытая рамка считывания 135, способная кодировать белок Rok, ингибирующий трансформацию у бактерий *B. subtilis*. Представлялось важным охарактеризовать данный полипептид и определить его роль в трансформации, что имело принципиальное значение при введении

стот трансформации рассчитанные на 1 мкг ДНК плазмиды рKS1). Кроме того, было установлено, что мутация гена *rok* не влияла на частоту конъюгационного переноса плазмиды рBS72. Частота переноса исходной и мутантной плазмид в изогенной системе бактерий *B. subtilis* составила 10^{-2} – 10^{-3} при скрещиваниях в жидкой среде в течение 1, 2, 3, 4 и 24 ч (приведены частоты переноса рассчитанные относительно количества клеток донора).

Следующий этап работы был посвящен созданию мобилизуемого вектора рKS1. Для этого в его состав с использованием генно-инженерных манипуляций (ПЦР, рестрикция) был встроены *mobV*-сайт размером 1863 п.н. плазмиды рBC16, обеспечивающий ее конъюгационный перенос плазмидой рBS72 [6]. На основании ПЦР- и рестрикционного анализа было установлено, что полученная конструкция содержала все функционально значимые участки для ее дальнейшего использования. В частности, термочувствительный по репликации *rep*-ген, *mobV*-сайт, ген эритромицинрезистентности, а также два полилинкера, расположенных перед и за геном канамицинрезистентности: *BseYI*, *PspFI*, *XmaI*, *SmaI*, *SpeI*, *NotI*, *SacII*, *BstXI*, *BstZ17I* и *HindIII*, *SbfI*, *StuI*, *XhoI*, *BglII*, *NcoI*, *MluI*, *ZraI*, *SalI* соответственно, пригодные для встраивания фрагментов чужеродной ДНК (рис. 2). Поскольку *mobV*-сайт изолировали с использованием ПЦР, не исключали возможности наличия в нем нуклеотидных замен и, как следствие, потерю функциональной активности. Для доказательства способности встроеного *mob*-сайта обеспечивать конъюгационный перенос плазмиды рKS1 (обозначена как рKSmob) ее вносили в бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду рBS72 с нарушенным геном *rok*, и проверяли частоту ее переноса в скрещиваниях с природными бактериями рода *Bacillus* (табл. 1).

В результате при скрещивании в течение 3 и 24 ч был установлен конъюгационный перенос вектора рKS1mob в клетки всех исследованных бактерий. При этом частота его переноса в клетки бактерий *B. subtilis* d16 и *B. licheniformis* FD9 составила соответственно 10^{-4} и 10^{-6} вне зависимости от времени скрещивания. Тогда как в клетки *B. velezensis* 713A перенос вектора снижался со временем и составил 1.80×10^{-6} при скрещивании в течение 3 и 2.93×10^{-8} при скрещивании в течение 24 ч (табл. 1).

Установлено, что в клетках отобранных трансконъюгатов отсутствовала мобилизующая плаزمиды рBS72, а векторная молекула рKS1mob не наследовалась при культивировании бактерий в неселективных условиях при 37°C. Полученные результаты обосновали возможность использования вектора рKS1mob для клонирования фрагментов гена *codY* природных бактерий *B. licheni-*

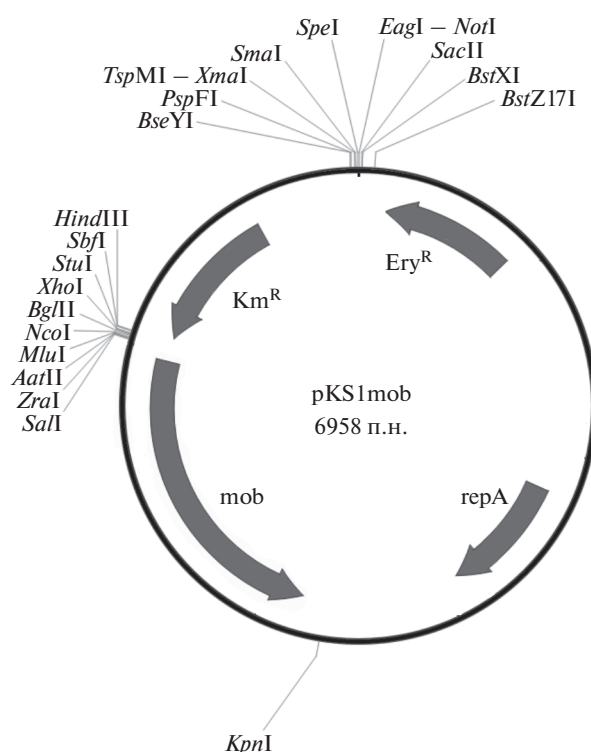


Рис. 2. Схема организации вектора рKS1mob: *rep* – ген, кодирующий термочувствительный белок инициации репликации плазмиды рKS1; *mob* – сайт, обеспечивающий конъюгационный перенос вектора путем мобилизации; *Ery^R* – ген, определяющий устойчивость к эритромицину; *Km^R* – ген, определяющий устойчивость к канамицину; *BseYI*, *PspFI*, *XmaI*, *SmaI*, *SpeI*, *NotI*, *SacII*, *BstXI*, *BstZ17I* и *HindIII*, *SbfI*, *StuI*, *XhoI*, *BglII*, *NcoI*, *MluI*, *AatII*, *ZraI*, *SalI* – уникальные сайты рестрикции.

formis FD9 с целью последующей инактивации данной детерминанты.

Ген *codY* был изолирован с использованием техники перекрывающейся ПЦР, с последующим встраиванием в его состав гена канамицинрезистентности. Фрагмент гена *codY*, маркированный геном канамицинрезистентности был встроены в вектор рKS1mob (рис. 3). Следует отметить, что все манипуляции осуществляли с использованием бактерий *E. coli*, что являлось наиболее оптимальным при создании генно-инженерных конструкций.

Полученной гибридной плазмидой трансформировали коллекционные бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду рBS72 с нарушенным геном *rok*. Полученный донорный штамм скрещивали с бактериями *B. licheniformis* FD9. В результате конъюгационных скрещиваний трансконъюганты бактерий *B. licheniformis* были отобраны с частотой 7.9×10^{-5} (в пересчете на количество клеток донора) на минимальной среде с добавлением канами-

Таблица 1. Частота конъюгационного переноса вектора pKS1mob в клетки бактерий рода *Bacillus*

Реципиент	Время скрещивания, ч	Частота конъюгационного переноса вектора pKS1mob
<i>B. subtilis</i> d16	3	1.51×10^{-4}
	24	1.63×10^{-4}
<i>B. licheniformis</i> FD9	3	1.11×10^{-6}
	24	2.71×10^{-6}
<i>B. velezensis</i> 713A	3	1.80×10^{-6}
	24	2.93×10^{-8}

Примечание: приведены частоты переноса относительно количества клеток донора.

цина в концентрации 50 мкг/мл. Было установлено, что отобранные трансконъюганты при выращивании в неселективных условиях стабильно наследовали маркер канамицинрезистентности и не содержали устойчивости к эритромицину (ген локализовался в плазмиде pKS1mob). Это свидетельствовало в пользу того, что в результате гомологичной рекомбинации произошла замены гена *codY* дикого типа на его фрагмент, содержащий ген канамицинрезистентности. Отсутствие в хромосоме плазмидного репликона дополнительно подтверждено с использованием ПЦР-анализа.

Сравнительный анализ антифунгальной активности исходного и мутантного штаммов *B. licheniformis* FD9 показал, что нарушение в гене *codY* не влияло на его способность подавлять развитие гриба *Botrytis cinerea*, полностью название рода (табл. 2). В то же время относительно фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* полностью и *Alternaria radicina* полностью уровни антимикробной активности бактерий дикого типа и мутанта отличались и зависели от времени их культивирования. При этом наиболее высокие значения активностей, определяемые по размеру зоны задержки роста гриба, наблюдались для мутантного штамма (различия статистически достоверны, $p < 0.001$).

Таким образом, в результате выполнения исследования создана конъюгационная система доставки векторов для молекулярного клонирования в клетки бактерий рода *Bacillus*. Для этого отобран мутантный вариант плазмиды pBS72 с нарушенным геном *rok*, не препятствующий введению векторов методом трансформации в содержащие его клетки и сохраняющий на уровне дикого типа конъюгационные свойства. Сконструирован вектор, содержащий *mobV*-сайт (pKS1mob), обеспечивающий его конъюгационный перенос плазмидой pBS72 в клетки природный бактерий рода *Bacillus*.

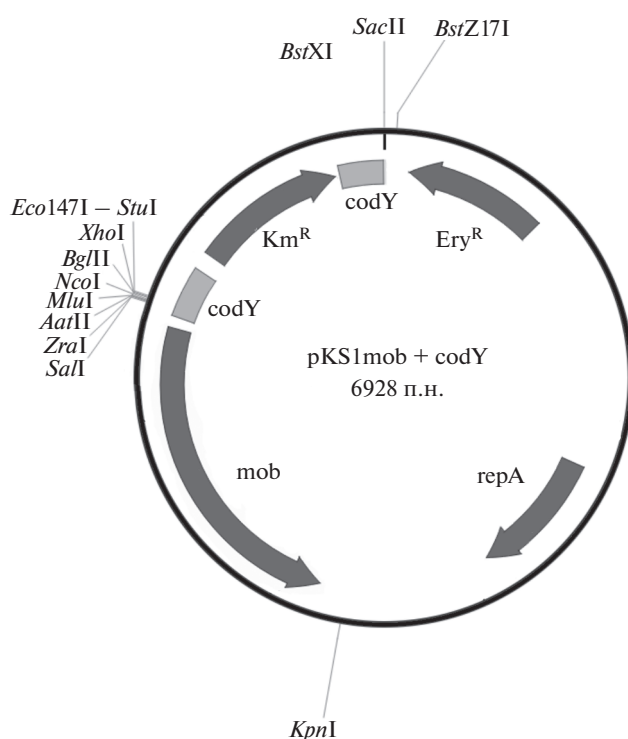


Рис. 3. Схема организации вектора pKS1mob с клонированными фрагментами гена *codY*: *rep* – ген, кодирующий термочувствительный белок инициации репликации плазмиды pKS1; *mob* – сайт, обеспечивающий конъюгационный перенос вектора путем мобилизации; *Ery^R* – ген, определяющий устойчивость к эритромицину; *Km^R* – ген, определяющий устойчивость к канамицину; *codY* – фрагменты гена *codY* бактерий *B. licheniformis* FD9; *SacII*, *BstZ17I*, *StuI*, *XhoI*, *BglII*, *NcoI*, *MluI*, *ZraI*, *AatII*, *SalI* – уникальные сайты рестрикции.

печивающий его конъюгационный перенос плазмидой pBS72 в клетки природный бактерий рода *Bacillus*. Способность вектора pKS1mob копироваться в клетках *E. coli* и наличие двух полилинкеров вокруг гена канамицинрезистентности позволяет клонировать в него фрагменты анализируемых генов с использованием традиционных генно-инженерных подходов. Присутствие в векторе pKS1mob термочувствительной системы репликации позволяет направленно инактивировать исследуемые гены для последующего функционального анализа. Преимущество созданной системы состоит в том, что для введения векторов существенно сокращаются материальные и временные затраты. Искомые мутантные варианты можно отобрать на минимальной агаризованной среде с канамицином при 37°C (отсутствие триптофана является контрселектирующим маркером) через 3 ч после скрещивания в жидкой полноценной среде при 30°C донорных и реципиентных бактерий рода *Bacillus*. При этом в качестве доно-

Таблица 2. Антимикробная активность исходного и мутантного штаммов *B. licheniformis* FD9

Патоген	Зона задержки роста гриба бактериями, мм			
	дикий тип <i>B. licheniformis</i> FD9		мутант <i>B. licheniformis</i> FD9*	
	время культивирования бактерий, ч			
	24	48	24	48
<i>F. culmorum</i>	21.2 ± 3.0	14.4 ± 4.0	12.8 ± 4.0	32.0 ± 2.0
<i>B. cinerea</i>	25.6 ± 4.0	29.5 ± 4.0	27.2 ± 4.0	29.6 ± 4.0
<i>A. radicina</i>	17.8 ± 2.0	27.2 ± 3.0	38.6 ± 3.0	15.1 ± 3.0

*Бактерии *B. licheniformis* FD9 с инактивированным геном *codY*.

ров необходимо использовать бактерии *B. subtilis* 168, содержащие конъюгативную плазмиду pBS72 с нарушенным геном *rok* и мобилизуемый вектор с фрагментами анализируемого гена.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований “Биотехнологии-2” (задание 3.6.2) и гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ Б21-142).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harwood C.R., Mouillon J.M., Pohl S., Arnau J. // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
2. Burton A.T., Kearns D.B. // J. Bacteriol. 2020. V. 202. № 18. P. e00290-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00290-20>
3. Singh P.K., Ramachandran G., Duran-Alcalde L., Alonso C., Wu L.J., Meijer W.J. // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. № 10. P. 2812–2825. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02819x>
4. Jeong D.E., Kim M.S., Kim H.R., Choi S.K. // Front. Microbiol. 2022. V. 13. P. 802040. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.802040>
5. Brophy J.A.N., Triassi A.J., Adams B.L. // Nat. Microbiol. 2018. V. 3. P. 1043–1053. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0216-5>
6. Gurinovich A.S., Titok M.A. // Microbiology. 2022. V. 91. № 4. P. 395–408. <https://doi.org/10.1134/S002626172230018X>
7. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Jannière L. // Plasmid. 2003. V. 49. № 1. P. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
8. Gurinovich A.S., Titok M.A. // Microbiology. 2020. V. 89. № 6. P. 660–669. <https://doi.org/10.1134/S0026261720060065>
9. Shatalin K.Y., Neyfakh A.A. // FEMS Microbiology Letters. 2005. V. 245. № 2. P. 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.029>
10. Harwood C.R., Cutting S.M. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. / Ed. C.R. Harwood and S.M. Cutting Chichester, New York: Wiley, 1990. 581 p.
11. Anagnostopoulos C., Spizizen J. // J. Bacteriol. 1961. V. 81. № 5. P. 741–746. <https://doi.org/10.1128/jb.81.5.741-746.1961>
12. te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
13. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 468 p.
14. Poluektova E.U., Fedorina E.A., Lotareva O.V., Prozorov A.A. // Plasmid. 2004. V. 52. P. 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.07.001>
15. Fujita Y, Satomura T, Tojo S, Hirooka K. // J. Bacteriol. 2014. V. 196. P. 3793–3806. <https://doi.org/10.1128/JB.02055-14>
16. Hoa T.T., Tortosa P., Albano M., Dubnau D. // Mol. Microbiol. 2002. V. 43. № 1. P. 15–26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02727.x>
17. Smits W.K., Grossman A.D. // PLoS Genet. 2010. V. 11. № 6. P. e1001207. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001207>

Conjugation Vector Delivery System for Molecular Cloning into Cells of Bacteria of The Genus *Bacillus*

A. S. Gurinovich^a, I. A. Fedyushko^a, and M. A. Titok^a, *

^a Department of Microbiology, Biological Faculty, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: ma_titok@bsu.by

A delivery system for vectors for molecular cloning into bacterial cells of the genus *Bacillus* has been developed. A specific feature of the developed system is the use of the pBS72 plasmid, which provides the conjugative transfer of the conditionally lethal vector pKS1mob obtained into the cells of the studied bacteria. The ability of vector pKS1mob to replicate in *Escherichia coli* and *B. subtilis* cells at a low temperature (30°C), the presence of two polylinkers around the kanamycin resistance gene makes it possible to clone target gene fragments into its composition using traditional genetic engineering approaches. Inactivation of the *rok* gene in the pBS72 plasmid made it possible to transform the strain containing it with the constructed vector pKS1mob with high efficiency. Crossing the donor strain *B. subtilis* 168, containing conjugative pBS72 and pKS1mob mobilizable plasmids, with a recipient strain of the genus *Bacillus* made it possible to introduce the pKS1mob plasmid into it. The possibility of using the created system for inactivation of gene *codY* of bacteria *Bacillus licheniformis* was shown.

Keywords: *B. subtilis*, pBS72 plasmid, Rok protein, vector pKS1mob, conjugation transfer, competence