

УДК 579:577.151:615

©Коллектив авторов

БАЗА ДАННЫХ ПРИРОДНЫХ И ТРАНСГЕННЫХ СВЕЯЩИХСЯ МИКРООРГАНИЗМОВ "BIOLUMBASE"

*С.Е. Медведева, А.Н. Бояндин, Ю.П. Ланкин, Д.А. Котов, Т.В. Каргатова,
Э.К. Родичева, Л.Ю. Попова*

Институт биофизики СО РАН, Красноярск
660036, г. Красноярск, Академгородок, эл. почта: ccibso@ibp.ru, lubg@ibp.ru;
факс: (3912) 43-34-00; тел.: (3912) 49-45-27

Широкое применение биолуминесценции как маркерного признака в медицине и экологии требует систематизации информации об особенностях структуры и функционирования биолуминесцентных систем, клонированных в трансгенных микроорганизмах, а также о характеристиках векторов и штаммов-носителей. Разработана база данных, содержащая информацию о структурной организации и механизмах регуляции генетических биолуминесцентных систем известных видов светящихся бактерий, а также механизмах люциферазной реакции. Созданы необходимые программные модули, в том числе компоненты взаимодействия с базой данных, что позволяет вносить новую и редактировать имеющуюся информацию.

Ключевые слова: база данных, природные и трансгенные светящиеся бактерии

ВВЕДЕНИЕ. Биолуминесценция является уникальным природным явлением, характерным для живых организмов различных систематических групп, в том числе, микроорганизмов. Свечение клетки связано с ее метаболической активностью как через общие субстраты, так и через единые регуляторные механизмы. Гены, ответственные за биолуминесценцию, широко клонируются в различных микроорганизмах в заданном окружении генов. Это дает возможность оценивать по интенсивности и динамике свечения уровень и стабильность экспрессии не только самих генов, обуславливающих свечение, но и - косвенно - других генов в различных условиях, что при использовании иных методов требует более длительного и дорогостоящего анализа.

Высокая чувствительность люминесцентной реакции к воздействию различных факторов в сочетании с возможностью регистрации отдельных излучаемых квантов - одно из главных преимуществ биолуминесценции перед многими традиционными маркерными системами. Реакция биолуминесценции на изменение условий существования является удобной тест-системой, используемой для анализа различных соединений - прежде всего субстратов, участвующих в реакции биолуминесценции (FMN, NADH, алифатических альдегидов и жирных кислот, кислорода) [1]. Широкое применение нашли биолуминесцентные биотесты в экологии и медицине для обнаружения низких концентраций ксенобиотиков и антибиотиков [2-6]. Большое значение при этом имеют возможности клонирования lux-генов в исходно несветящихся штаммах бактерий, причем в состав регуляторных зон биолуминесцентных оперонов вводятся промоторы специфических оперонов [7-13]. Соответственно, наличие в среде соединений-индукторов приводит к активации специфических промоторов и экспрессии сшитых с ними lux-оперонов, причем уровень свечения микроорганизмов во многих случаях проявляет явную зависимость от концентрации исследуемого вещества.

В настоящее время в мире накоплен большой объем информации, относящейся к описанию существующих светящихся микроорганизмов, их характеристик, особенностей экспрессии свечения, методик их поддержания в коллекциях, способов клонирования

люминесцентных генов в различных векторах и получения на их основе трансгенных штаммов. Много внимания уделяется рассмотрению различных аспектов применения трансгенных штаммов для тех или иных задач, дальнейших перспектив и рекомендаций к использованию. Однако такая информация остается в значительной степени неструктурированной и рассеянной по множеству научных статей и монографий, что затрудняет ее поиск и использование.

Цель создания базы данных "Biolumbase" состоит в сборе и анализе информации по светящимся бактериям и их биолуминесцентным системам в одном легкодоступном источнике, чтобы проводить поиск и сравнение различных штаммов и векторов, обладающих lux-генами и другими требуемыми характеристиками, по степени пригодности для решения конкретных задач.

МЕТОДИКА. Информационная система разрабатывается в технологии Клиент/сервер, как наиболее перспективной для проектов такого масштаба и позволяющей обеспечить эффективное взаимодействие пользователя с сервером для сетевых приложений, включая Internet и локальные сети. В качестве сервера базы данных применяется Sybase Adaptive Server Anywhere. Проектирование системы произведено с помощью CASE - средства Computer Associates ERwin 4.0. Клиентское программное обеспечение создается с использованием двух программных продуктов: Sybase Power Builder 7.0 (с PFC) и Borland C++ Builder 6.0 [14, 15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Разработаны принципы проектирования базы данных (БД) светящихся микроорганизмов, учитывающие как типичные легко формализуемые сведения, так и функциональную и иную информацию о бактериях и клонированных элементах. Перед созданием БД был откорректирован механизм поддержания ссылочной целостности базы данных, включивший в себя разработку триггеров сохранения целостности базы данных (TU_, TI_, TD_). Разработана и отлажена расширенная библиотека стандартных классов Sybase Power Builder 7.0 with PFC, позволяющая быстро и эффективно создавать профессиональные приложения конечного пользователя для любых СУБД практически без существенного изменения программного кода. С помощью PowerBuilder улучшены и дополнены стандартные модули интерфейса клиентской части приложения, а также созданы собственные, включившие в себя: разработку и создание стилей редактирования (поля для заполнения, маски, выпадающие списки). Созданы основные библиотеки объектов (UserObject, DataWindow, Window, элементы управления DataWindow, панели кнопок), разработана структура приложения и созданы первичные и вторичные окна приложения для заполнения базы данных. В создаваемый программный продукт были включены средства и механизмы, предоставляемые интерфейсом доступа к базам данных Borland Database Engine (BDE).

Разработка БД требовала решения ряда связанных задач, к важнейшим из которых можно отнести следующие:

- 1) определение перечня объектов (таких как штаммы, векторы и др.), информация о которых должна храниться в базе данных BiolumBase, их характеристик (атрибутов) и логических отношений (связей) между ними;
- 2) построение модели БД, включая определение структуры конкретных таблиц, типов содержащихся в них полей и межтабличных связей;
- 3) физическая реализация табличной структуры и разработка программного обеспечения серверной части БД;
- 4) разработка клиентской части, позволяющей администраторам BiolumBase осуществлять ручной и автоматизированный ввод данных;
- 5) анализ имеющейся в мире литературы по проблематике создаваемой БД и ввод соответствующей информации в BiolumBase;
- 6) организация работы со специалистами по сбору информации.

В настоящее время технические задачи из вышеприведенного списка успешно решены. Созданная база данных имеет реляционную структуру, основой которой является система связанных между собой заданными отношениями таблиц, каждая из которых описывает определенную информационную категорию. Таблицы имеют разные объем и значения - от ключевых, описывающих основные категории информационной системы (штаммы, вектора, lux-системы и т.д.), до вспомогательных справочников, содержащих сведения по какому-то одному типу характеристик.

Основное внимание уделялось задаче обеспечения исследователей содержательной и удобной по структуре информацией о существующих в мире штаммах природных и трансгенных микроорганизмов, содержащих гены люминесценции, а также об условиях

экспрессии последних. Создаваемая БД объединяет в себе легко- и сложно-формализуемые характеристики соответствующих объектов, имеет возможность предоставлять как текстовую, так и - при необходимости - графическую информацию. Самым сложным моментом работы над электронной коллекцией было установление связей между всем многообразием свойств рассматриваемых объектов и обеспечение быстрого способа получения информации о любом интересующем атрибуте.

В настоящее время база данных биолюминесцентных организмов "BiolumBase" спроектирована для двух различных типов светящихся микроорганизмов - природных и трансгенных, связанных между собой по общему признаку - наличию *lux*-систем (естественных или клонированных), обеспечивающих биолюминесценцию (рис.1).

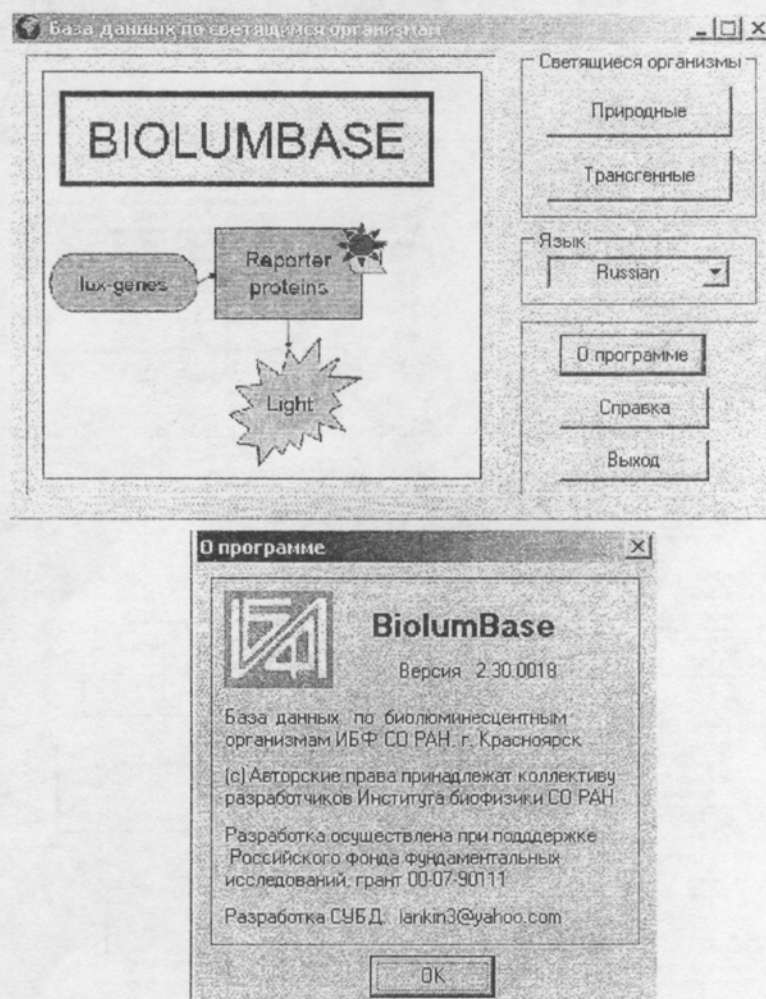


Рисунок 1.
Заглавное окно БД "BiolumBase"

Логически БД содержит несколько основных блоков, центральным из которых является блок, описывающий типы биолюминесцентных систем известных видов светящихся бактерий, которые используются как репортерные системы в рекомбинантных конструкциях, а также механизмы биолюминесцентной реакции и регуляцию экспрессии *lux*-оперонов. Информация по природным светящимся микроорганизмам содержит описание 140 таксономических, морфологических, физиолого-биохимических характеристик и хранится в таблицах соответствующих блоков коллекции (рис.2), а информация об особенностях функционирования люминесцентной системы - в таблицах центрального блока. Логическая схема связей в центральном блоке представлена на (рис.3). Одним из основных подразделов центрального блока является подраздел

Base table block

Table block for Species	Factors
Table block for Strain	Lux-system
Collections	Area of use
Chemical composition cell	Publication

Species block

Base	Table for Species
Organism	Method cultivation
Kingdom	Metabolic reactions
Group	Metabolic path
Familia	Relat to oxygen
Genus	Relat to temperature
Species	Relat to nutrient source
	Pathogenicity

Id Colony: 1

Id Strain: 1

Optic Prop: semi-transparent

Colony Struct: uniform

Profil: convex

Growth: growth on solid ag

Color: white

Form Colony: spherical

consist: viscous

Border: regular

Surface Col: smooth

Species Table

Retrieve	First	Next	Prior	Last	New	Delete	Apply	EXIT
<div>Id Species: 1</div> <div>Species Name: Photobacterium phosphoreum</div> <div>Sinonimname: Micrococcus phosphoreum, Photobac</div> <div>Typestrainname: ATCC 1140: NCIMB 1282</div> <div>Year Name: 1878</div> <div>Author Name: Cohn</div> <div>Author Rename: Beijerinck</div> <div>Year Rename: 1878</div>								

Рисунок 2.
Пример таблицы раздела "Природные светящиеся микроорганизмы"

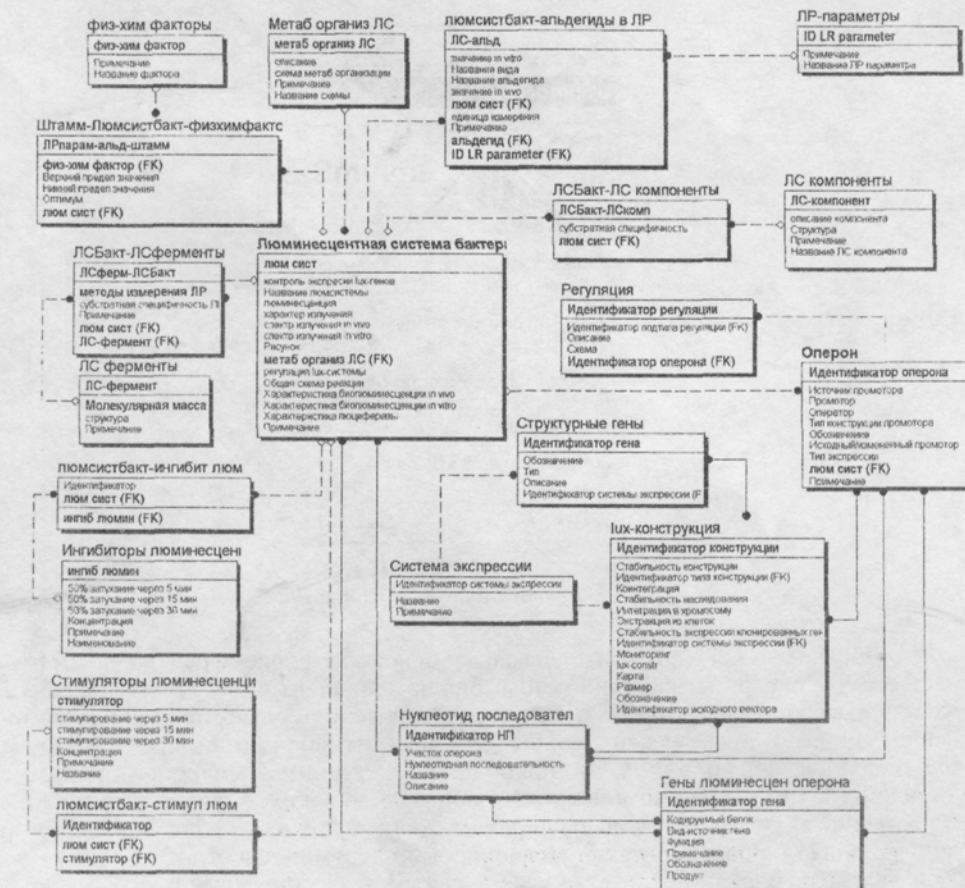


Рисунок 3.
Логическая схема центрального блока "Люминесцентная система" БД "BiolumBase"



Рисунок 3 Б.
Логическая схема центрального блока "Люминесцентная система" БД "BiolumBase"

"Оперон". В нем описаны различные характеристики *lux*-оперона, касающиеся, в первую очередь, структурной организации известных *lux*-оперонов светящихся бактерий, а также особенностей их регуляции в исходных клетках-хозяевах и в новых рекомбинантных конструкциях (рис.4).

Свойства *lux*-систем, обусловленные метаболической активностью клеток светящихся бактерий, представлены на рис.5. Такими свойствами являются присущие каждому виду и даже штамму определенные характеристики светового излучения, что определяется ферментом люциферазой и субстратами реакции биолуминесценции, а также типом ее регуляции на уровне генома, что отражается в динамике люминесценции при росте клеток и максимальном уровне интенсивности свечения.

Для трансгенных микроорганизмов, несущих репортерную биолуминесцентную систему из морских светящихся бактерий, общими характеристиками клонированных *lux*-систем является источник *lux*-системы и механизмы, обеспечивающие экспрессию биолуминесценции в исходном штамме. В блоке прописаны более 150 характеристик трансгенных светящихся микроорганизмов, включающих ряд уникальных сведений.

33. Оперон

Название: luxCDABE-PL1	Обозначение: luxCDABE	Содержится в конструкции: pPHL7
Промотор: lac/lux	Тип <i>lux</i> -системы: Photobacterium leiognathi	Нуклеотидные последовательности: luxA_{PL54} luxB_{PL54} luxC_{PL54} luxD_{PL54}
Источник промотора: E. coli, P. leiognathi	Тип экспрессии: Индукцибельная	Необходимые экзогенные субстраты:
Исходный/Измененный промотор: Измененный	Тип конструкции промотора: Химерный	Имеющиеся <i>lux</i> -гены: luxA (Ph. leiognathi 54) luxB (Ph. leiognathi 54) luxC (Ph. leiognathi 54) luxD (Ph. leiognathi 54)
Примечание: Контроль в клетках E. coli Z905 обеспечивается теми же регуляторными компонентами, что и лактозный оперон (Per-ind) и другие катаболитзависимые опероны (CAP-cAMP). Промотор химерный: lac-про и lux-про. Специфичный контроль клетки-хозяина: Per-ind (мутация в lac-про по связыванию CAP). Общеклеточный катаболитный контроль: CAP-cAMP (luxPer не синтезируется в клетках E. coli Z905).	Тип регуляции: CAP-cAMP-зависимая lacREP-ind-зависимая	

Рисунок 4.
Пример представления основных свойств оперона люминесцентной системы из светящихся природных бактерий в таблицах центрального блока БД "BiolumBase"

The screenshot displays the BiolumBase database interface, which is organized into several panes and forms:

- Base table block:** Contains links to 'Table block for Species', 'Table block for Strain', 'Collections', 'Chemical composition cell', 'Factors', 'Lux-system', 'Area of use', and 'Publication'.
- Biolumbase - database for natural luminous organisms:** A descriptive title for the database.
- Lux-system:** Includes a 'Bacterial lux-system' section and 'LS parameters'.
- Lux-system parameters:** A form for entering parameters like 'Id Lrp Ald Ls', 'Id Lum Syst', 'Id Lrparam', 'Aldname', and 'Unit'.
- Strain:** A form for entering strain-specific data such as 'Id Strain', 'Number lbro', 'Aut Isolat', 'Place Isolat', 'Date Isolat', 'Place Dep', 'Deposit Data', 'Geo Coord', 'Date Save', 'Col Getting', 'Gc In Dna', and 'Gomol Dna Rna'.
- Lux-system details:** A form for entering detailed lux-system information, including 'Id Lum Syst', 'Lsname', 'luminescence' (Yes/No), 'Charact Rad', 'In Vivo Spectr Rad', 'In Vitro Spectr Rad', 'Lux Gen Expres', 'Lux Syst Regul', 'Lux Gene Str', and 'Id Metab Ls'.
- LS components:** A form for entering component information like 'Id Lsact Lscomp', 'Substrspecific', 'Id Lum Syst', 'Id Ls Compon', and 'Id Ls Compon'.

Рисунок 5.

Пример представления основных свойств люминесцентной системы светящихся природных бактерий в таблицах центрального блока БД "BiolumBase"

Важными для исследователей являются вариабельность экспрессии *lux*-генов в зависимости от конструкции клонированной системы, используемого для клонирования вектора, типа промотора и типа метаболизма новой клетки-хозяина (рис. 6).

В БД "BiolumBase" предусмотрено внесение связей между индукцией и проявлением люминесценции в зависимости от действующих факторов среды обитания. Влияние биотических, абиотических и антропогенных факторов на проявление биолуминесцентных генетических систем трансгенных и природных светящихся бактерий является ключевым моментом для обоих разделов базы данных. Это имеет большое значение для успешного развития фундаментальных и прикладных исследований по использованию репортерных *lux*-генов.

Благодаря глубокой проработке структур русскоязычной и англоязычной СУБД они спроектированы таким образом, что дополнительные настройки программ для работы с базой данных практически не требуются и ограничиваются стандартной настройкой псевдонимов и ODBC-драйверов. Для ускорения поиска нужной записи введены отдельные формы, позволяющие просматривать таблицы и находить в них нужную запись не только по ее полному значению, но и по ее фрагментам в непрерывном режиме. Непрерывный режим позволяет вести поиск автоматически после ввода начальных символов искомой записи. Кроме того, разработаны универсальные программные средства для корректного удаления произвольных записей из любой таблицы базы данных, интегрирующие в себе всю информацию о структуре межтабличных связей БД и позволяющие из одной формы откорректировать все ссылки на текущую запись перед ее удалением. При этом имеется возможность вызова любой из форм, отображающих таблицы, в которых имеются ссылки на удаляемую запись. Настройка связей между таблицами осуществляется выбором связанной записи типа "один ко многим" из выпадающего списка значений либо "многие ко многим" путем вызова дополнительной формы. Предусмотрена возможность редактирования связанных таблиц путем вызова их форм из текущей формы. В процессе создания СУБД был разработан ряд отладочных

21. Генноинженерная конструкция

Обозначение pPHL7	Публикации Брильков - 1995 Илларионов - 1985 Илларионов - 1990	Штаммы-носители Escherichia coli Z905-137 Escherichia coli Z905-165 Escherichia coli Z905-2
Размер, т.п.н. 2,6999998092651	Наличие lux-генов Y	Опероны apR luxCDABE-PL1
Тип конструкции Плазмида	Известны ли случаи интеграции в хромосому? N	Известны ли случаи коинтеграции? N
Система экспрессии Граммотрицательных микроор.	Генно-инженерная конструкция pPHL7	Питательные среды LBA M9 M9Gc
Исходный вектор	Нуклеотидные последовательности lux-proPL luxAPL54 luxBPL54	Структурные гены ApR luxA (Ph. leiognathi) luxB (Ph. leiognathi)
Способы передачи Слияние протопластов Трансформация		

Клетки-хозяева | Экстракция из клеток | Стабильность наследования | Стабильность конструкции | Мониторинг

Возможен по двум генетическим маркерам (биолюминесценция и устойчивость к ампициллину). Наличие двух маркеров позволяет обнаруживать клетки E. coli Z905 в ассоциации аборигенных бактерий, проявляющих устойчивость к б-лактамным антибиотикам.

Рисунок 6.

Пример представления основных свойств генноинженерной конструкции в разделе "трансгенные светящиеся микроорганизмы" БД "BiolumBase"

программ, предназначенных для тестирования СУБД, выявления и устранения ошибок, встречающихся на этапе разработки, корректировки связей между таблицами на уровне программного интерфейса.

БД "BiolumBase" представляет единую гипертекстовую сеть, давая возможность быстрого перехода между логически связанными между собой объектами, а также отбора объектов и их групп по тем или иным признакам. Разработанная структура БД позволяет хранить и отображать разнообразную информацию о содержащихся объектах, формализованную, текстовую и графическую информацию, а также документы, созданные другими приложениями. Вводимые в БД иллюстративные материалы (фотографии, схемы, карты распространения светящихся бактерий в мировом океане) наглядно демонстрируют их основные важные для исследователей свойства. Созданы библиографические справочники, включающие ссылки на разнообразные источники литературы по свойствам и областям использования микроорганизмов с lux-генами, выделенной из них люминесцентной системы, векторов и т.д. Включены некоторые расширенные публикации (аннотированные ссылки и статьи в pdf-формате), Web-ссылки на соответствующие ресурсы глобальной сети, в том числе и на Web-страницы мировых коллекций микроорганизмов и векторов.

Разрабатывается программа для публикации БД "BiolumBase" в сети Интернет в рамках сайтов Института биофизики СО РАН (<http://www.ibp.ru>; <http://lux.ibp.ru>). Сведения о свойствах природных светящихся бактерий коллекции ИБСО вошли в консолидированный Каталог микроорганизмов Российских коллекций, который размещен на сайте Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Подводя итог, можно отметить, что созданная информационная система позволяет в полной мере решать задачи накопления, обработки и поиска информации о светящихся природных и трансгенных микроорганизмах, генетических конструкциях с lux-генами, их свойствах и практическом применении. Дальнейшие задачи, стоящие в настоящее время перед разработчиками информационной системы, заключаются, прежде всего, в разработке программного обеспечения, позволяющего

осуществлять доступ к информационной системе через сеть Интернет. Будет продолжено также внесение новой информации о светящихся микроорганизмах и сферах их возможного применения в различных областях, в первую очередь для экологии и медицины.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №00-07-90111 и Лаврентьевского молодежного проекта СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hastings J.W., Johnson C.H. (2003) *Methods Enzymol.*, **360**, 75-104.
2. Gellert G. (2000) *Ecotoxicol Environ Saf.*, **45**(1), 87-91.
3. Czyz A., Plata K., Wegrzyn G. (2002) *J Appl Genet.*, **43**(3), 377-389.
4. Roda A., Guardigli M., Pasini P., Mirasoli M. (2003) *Anal Bioanal Chem.*, **377**, 826-833.
5. Kurittu J., Karp M., Korpela M. (2000) *Luminescence*, **15**, 291-297.
6. Simon L., Fremaux C., Cenatiempo Y., Berjeaud J.-M. (2001) *Appl Microbiol Biotechnol.*, **57**, 757-763.
7. McNab R., Ford S.K., El-Sabaeny A., Barbieri B., Cook G.S., Lamont R.J. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 274-284.
8. Barr H. (2003) *Technol. Cancer. Res. Treat.*, **2**(4), 281-282.
9. Kadurugamuwa J.L., Sin L.V., Yu J., Francis K.P., Kimura R., Purchio T., Contag P.R. (2003) *Antimicrob Agents Chemother.*, **47**(10), 3130-3137.
10. Luker G.D., Prior J.L., Song J., Pica C.M., Leib D.A. (2003) *J. Virol.*, **77**(20), 11082-11093.
11. Soling A., Rainov N.G. (2003) *Expert Opin Biol Ther.*, **3**(7), 1163-1172.
12. Turner I.H., Slavin A.J., McBride J., Levicnik A., Smith R., Nolan G.P., Contag C.H., Fathman C.G. (2003) *Ann. N Y Acad. Sci.*, **998**, 512-519.
13. Popova L., Kargatova T., Boyandin A., Lesnyak D. (2003) *Clinical laboratory*. 49 (9-10), 550.
14. Маклаков С.В. (2000) ВРwin и Erwin CASE - средства разработки информационных систем, Диалог-МИФИ, М.
15. Ульман Дж.Д., Уидом Дж. (2000) Введение в системы баз данных (пер. с англ.), Лори, М.

DATABASE OF NATURAL AND TRANSGENIC LUMINOUS MICROORGANISMS "BIOLUMBASE"

S.E. Medvedeva, A.N. Boyandin, Yu.P. Lankin, D.A. Kotov, T.V. Kargatova, E.K. Rodicheva,
L. Yu. Popova

Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Akademgorodok 660036, Russia; fax: (3912) 43-34-00,
tel.: (3912) 49-45-27, e-mail: ccibso@ibp.ru, lubg@ibp.ru

Wide application of bioluminescence as marker attribute in medicine and ecology requires ordering of the information on features of structure and functioning of bioluminescent systems cloned in transgenic microorganisms, and also about characteristics of vectors and strains-carriers. The database containing the information on the structural organization and mechanisms of regulation of genetic bioluminescent systems of known species of luminous bacteria, and also mechanisms of luciferase reactions is developed. Necessary program modules including components of interaction with the database are created. This allows to bring new data and to edit the available information.

Key words: database, natural and transgenic luminous bacteria