УДК 575.13:577.21

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНОВ ECA0852 И ECA0804 *БАКТЕРИЙ* ERWINIA CAROTOVORA *SUBSP.* ATROSEPTICA

С.А. Скобляков, В.Е. Мямин, А.Г. Песнякевич

Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* (*Eca*) – фитопатоген, поражающий одну из самых распространённых на территории Беларуси сельскохозяйственных культур – картофель. При инфицировании наземных частей растения развивается характерное заболевание «чёрная ножка» картофеля; на клубнях эрвиниоз проявляется в форме мягкой гнили. Основной причиной этих патологических состояний является комплекс ферментов, продуцируемых патогеном и разрушающих различные компоненты растительной клеточной стенки: целлюлозу, пектиновые вещества, белки [1].

Ключевую роль в патогенезе выполняют пектиназы, воздействующие на матриксный компонент клеточной стенки – пектин. В его структуре можно выделить неразветвленные (smooth regions) и разветвленные (hairy regions) участки. Первые представлены сравнительно простым типом полимера: гомогалактуронаном, состоящим из чередующихся остатков галактуроновой кислоты. Разветвленный пектин образован рамногалактуронаном I и II. Остов рамногалактуронана I образован дисахаридными звеньями α-L-рамноза-α-1,4-галактуроновая кислота, при этом рамнозный участок является точкой ветвления, к которой могут присоединяться боковые цепи арабинана, галактана или арабиногалактана. Рамногалактуронан II – более сложный полимер, имеющий короткий гомогалактуронановый остов, к которому присоединяются боковые цепи. В составе последних выявлено более десяти различных сахаров, в том числе достаточно редких (apiose, aceric acid) [2,3].

В настоящее время наиболее изученными факторами патогенности пектолитических бактерий рода Erwinia являются пектиназы, воздействующие на гомогалактуронан (пектат- и пектинлиазы, полигалактуроназы, пектинэстеразы и др.), в то же время ферменты, воздействующие на разветвленный пектин, практически не изучены [4].

После завершения работы по секвенированию и анализу генома *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 [5] был выявлен целый ряд генов потенциальных факторов патогенности, основная часть которых имеет сходство с ферментами, деградирующими гомогалактуронан; часть же генов может рассматриваться в качестве детерминант потенциальных пектиндеградирующих экзоферментов, разрушающих компоненты разветвленного пектина.

Продукт гена *eca0852* аннотирован как потенциальная секретируемая протеогликангидролаза, имеющая сходство с: 1) арабиногалактанэндо-1,4-β-галактозидазой *Pseudomonas fluorescens* (33,5% идентичности); 2) арабиногалактанэндо-1,4-β-галактозидазой *Thermotoga maritima* (33,4% идентичности); 3) арабиногалактанэндо-1,4-β-галактозидазой *Aspergillus aculeatus* (30,7% идентичности). Продукт еще одного обнаруженного гена – *eca0804* (*rhiE*) – аннотирован как рамногалактуронатлиаза, для которой выявлено сходство только с рамногалактуронатлиазой RhiE *Erwinia chrysanthemi* (60,1% идентичности).

Основной целью работы явилось создание генетических конструкций для инактивации указанных генов для последующего изучения их роли в патологическом процессе, вызываемом *Eca*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды

Штаммы бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* и *Escherichia coli* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – штаммы бактерий, использованные в работе

Штамм	Характеристика	Происхождение
E. atroseptica SCRI1043	прототроф, Rif^r	Коллекция НИЛ при кафедре микробиологии Белгосуниверситета
E. coli DH5α	F′/*endA1 hsdR17* ($r_k^-m_k^+$) *supE44* *thi-1 recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1* *Δ(lacZYA-argF)U169 deoR* (φ80*dlacΔ(lacZ)M15*)	Department of Microbial Genetics National Institute of Genetics Mishima, Japan

В работе использовали плазмиды, представленные в таблице 2.

Таблица 2 – плазмиды, использованные в работе

Плазмида	Характеристика	Происхождение
pUT::mini-Tn5*Sm*/*Sp*	Ap^r Sm^r mini-Tn5*Sm*/*Sp* суицидная плазмида для инсерционного мутанеза	[6]
pJQ200 mp19	mob^+ P15A MCS Gm^r *sacB*-ген из *Bacillus subtilis*	[7]
pUC18	Ap^r *lacPOZ'* вектор для клонирования	[8]
pBR322	Ap^r Tc^r	Коллекция НИЛ при кафедре микробиологии

		Белгосуниверситета

Таблица 2 (продолжение)

Плазмида	Характеристика	Происхождение
pAG1	Ap^r pUC18, несущая 1,9 т.п.н. ПЦР-продукт гена ECA0852 *E. atroseptica* SP234, гомологичного гену арабиногалактан-β-галактозидазы *Pseudomonas fluorescens*	Данная работа
pAG12	Tc^r pBR322, несущая 1,9 т.п.н. *Eco*RI-*Pst*I фрагмент из pAG1	Данная работа
pAG13	Tc^r Sm^r pAG12, несущая ECA0852:: *Sm*/*Sp* инсерцию в сайт *Sma*I	Данная работа
pAG14	Gm^r Sm^r pJQ200mp19, несущая 3,9 т.п.н. *Eco*RI-*Pst*I фрагмент из pAG13	Данная работа
pRG1	Ap^r pUC18, несущая 2 т.п.н. ПЦР-продукт гена *rhiE E. atroseptica* SP234	Данная работа
pRG12	Gm^r pJQ200mp19, несущая 2 т.п.н. *Sac*I-*Xba*I фрагмент из pRG1	Данная работа
pRG13	Gm^r Sm^r pRG12, несущая *rhiE*:: *Sm*/*Sp* инсерцию в сайт *Sca*I	Данная работа

Среды и реактивы

Для культивирования бактерий использовали полноценную среду LB при необходимости дополненную агар-агаром (15 г/л). Растворы антибиотиков добавляли до конечных концентраций: ампициллин (Ap) - 50 мкг/мл; налидиксовая кислота (Nal) -5 мкг/мл; стрептомицин (Sm) - 20 мкг/мкл; гентамицин (Gm) - 10 мкг/мкл.

Операции с ДНК

Выделение плазмидной и хромосомной ДНК, манипуляции с ДНК (рестрикция, лигирование), трансформацию бактерий плазмидной ДНК, электрофорез в агарозном геле проводили по стандартным методам, описанным в руководстве [9].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Компоненты полимеразной цепной реакции (ПЦР) и их концентрации приведены в таблице 3. Параметры ПЦР отображены на рисунке 1.

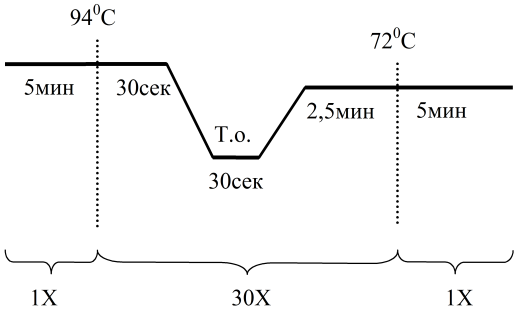
Амплификацию фрагмента хромосомной ДНК для инактивации гена *rhiE* осуществляли с использованием пары праймеров rgal1 и rgal2:

5′ -gggaatattGACGATCGAGGCGGGCTGTTA и

5′ -gggaatattGCCGTGCTGCGCTACTGGAG,

Таблица 3 – Компоненты ПЦР и их концентрации

Компонент	**Конечная концентрация**
Раствор ДНК	10 пг – 1 мкг / 100 мкл
Полимеразный буфер (10X)	1X
Смесь дезоксинуклеотидов (2 мМ)	0,2 мМ
Праймеры	0,2 мкМ
Taq ДНК-полимераза	2 ед./100 мкл



Изменение температуры в ходе реакции показано в виде кривой; этапы ПЦР разделены пунктиром, число их повторов указано под фигурными скобками, а продолжительность стадий – под соответствующими горизонтальными участками. Т.о. – температура отжига.

соответстве

нно. Строчными буквами на 5′ -конце указана достроенная область, не имеющая гомологии с матричной ДНК и несущая сайт рестрикции для последующего клонирования (подчеркнут); в случае пары праймеров rgal1 и rgal2 это сайт для рестриктазы *Ssp*I. Для отжига использовали температуру 55^0C.

В случае *eca0852* использовали праймеры agal1 и agal2:

5′ -gcctctagaGTATTCGCCCTGAGCACCTG и

5′ -gcctctagaTACTTTCCGCTATTAACATTCACC, соответственно. Подчеркнут сайт для рестриктазы *Xba*I. Для отжига использовали температуру 55^0C.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили на колонках GFX PCR с использованием Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences).

После взвешивания вырезанного фрагмента агарозного геля, содержащего ДНК, добавляли буфер для выделения (captur buffer) из расчета 10 мкл буфера на 10 мг массы геля. Выдерживали на водяной бане при 60^0C для растворения агарозы. Затем наносили полученную пробу на колонку и после непродолжительного инкубирования при комнатной температуре и короткого центрифугирования (12000 об/мин, 30 сек) удаляли отцентрифугированную жидкость и добавляли 500 мкл буфера для промывания (wash buffer), колонки сразу же центрифугировали (12000 об/мин, 30 сек). После этого добавляли 25 мкл буфера для элюции, инкубировали 1 мин при комнатной температуре и собирали элюат, содержащий ДНК, посредством центрифугирования (12000 об/мин, 1 мин).

"Затупление" липких концов с помощью *Pfu* ДНК-полимеразы

Компоненты реакции и их концентрации представлены в таблице 4. Составленную таким образом смесь инкубировали на водяной бане (температура 72^0C) в течении 20 минут.

Таблица 4 – Компоненты реакции и их концентрации

Компонент	**Конечная концентрация**
Раствор ДНК	50 пг – 1 мкг / 50 мкл
Полимеразный буфер для Pfu с $MgCl_2$ (10X)	1X
Смесь дезоксинуклеотидов (2 мМ)	0,2 мМ
Pfu ДНК-полимераза	1,25 ед./50 мкл
H_2O	-

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

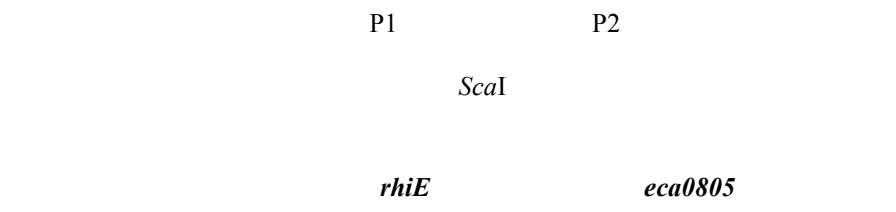
Констукции для инактивации изучаемых генов были созданы на основе суицидного мобилизуемого вектора pJQ200mp19 [7]. В его составе присутствует ряд структурных элементов, позволяющих вводить мутации в целевые гены посредством их рекомбинационной замены на мутантный вариант. Такие мутантные варианты были созданы посредством введения в последовательность изучаемых генов кассеты антибиотикорезистентности «омега».

Использованная в ходе работы схема создания генетических конструкций для направленной инактивации изучаемых генов включает 4 основных этапа: 1) амплификация соответствующего фрагмента хромосомной ДНК; праймеры для амплификации фрагментов хромосомной ДНК *Eca* были сконструированы с учетом следующих моментов: наличие уникального центрально расположенного сайта рестрикции в ПЦР-продукте, достаточно протяженные выше- и нижележащие области относительно последнего; 2) клонирование ПЦР-продукта; на этой стадии использовали вектор pUC18, позволяющий вести blue/white скрининг рекомбинантных плазмид; 3) инсерция кассеты антибиотикорезистентности в уникальный сайт рестрикции; 4) переклонирование полученной конструкции в вектор pJQ200mp19.

Создание генетической конструкции для инактивации гена eca0804 *(*rhiE*)*

На первом этапе был амплифицирован фрагмент хромосомной ДНК *Eca* SCRI1043. На рисунке 2 рамка амплификации ограничена праймерами P1 и P2 (rgal1 и rgal2, соответственно). Отжиг rgal1 происходит в пределах гена *rhiE*, на расстоянии 340 п.н. от его старт-кодона; rgal2 отжигается в пределах нижележащего гена *eca0805*, на расстоянии 570 п.н. от стоп-кодона *rhiE*.

Очищенный ПЦР-продукт (протяженность ок. 2000 п.н.) обрабатывали рестриктазой *Ssp*I и клонировали в мультикопийном векторе pUC18, предварительно обработанном *Sma*I. В результате получена плазмида pRG1.



Рамка амплификации ограничена праймерами P1 и P2 (rgal1 и rgal2, соответственно); *Sca*I – уникальный сайт рестрикции

Рисунок 2 – Схема амплификации хромосомного фрагмента

На следующем этапе было сделано отступление от описанной выше схемы, что обусловлено уникальным сайтом рестрикции для *Sca*I, в который изначально было запланировано производить инсерцию кассеты антибиотикорезистентности. Сайт для этого фермента присутствует в pUC18 (2177 п.н.), в связи с этим *Sac*I-*Xba*I фрагмент из pRG1 переклонировали в pJQ200mp19 (получена плазмида pRG12). После этого была

осуществлена инсерция кассеты антибиотикорезистентности в упомянутый сайт для *Sca*I, расположенный в районе 1210 п.н. от старт кодона. В данном случае использовали кассету устойчивости к стрептомицину (Sm) и спектиномицину (Sp), вырезанную рестриктазой *Sma*I из pUT::mini-Tn5*Sm*/*Sp* (плазмида pRG13). Полученная таким образом плазмида может быть использована для рекомбинационной замены интактного гена *rhiE* в хромосоме *E. atroseptica* SCRI1043 на мутантный.

Создание генетической конструкции для инактивации гена *eca0852*

На начальном этапе был амплифицирован фрагмент хромосомной ДНК *Eca* SCRI1043 размером около 1900 п.н., включающий большую часть целевого гена *eca0852* и часть вышележащего гена *eca0851* (рисунок 3).

Для амплификации использовали пару праймеров agal1 и agal2, отжигающиеся на 590 п.н. выше и 1280 п.н. ниже от старт-кодона *eca0852*, соответственно. Очищенный ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазой *Xba*I и клонировали в векторе pUC18 (плазмида pAG1). В качестве сайта инсерции кассеты антибиотикорезистентности был выбран сайт для *Sma*I, расположенный на расстоянии 540 п.н. от старт-кодона *eca0852*. Это внесло определенные коррективы в дальнейший ход работы, поскольку сайт для данной рестриктазы имеется как в векторе pUC18, так и в pJQ200mp19. Поэтому на следующем этапе работы *Eco*RI-*Pst*I-фрагмент из pAG1 переклонировали в вектор pBR322, предварительно обработанный этими же рестриктазами. Критериями отбора штаммов, несущих рекомбинантную плазмиду

P1 P2

*Sma*I

eca0851 ***eca0852***

Рамка амплификации ограничена праймерами P1 и P2 (agal1 и agal2, соответственно); *Sma*I – уникальный сайт рестрикции

pAG12, были устойчивость к тетрациклину и чувствительность к ампициллину; последнее свойство обусловлено тем, что после рестрикции ферментами *Eco*RI и *Pst*I из pBR322 удаляется и часть гена β-лактамазы. Только после этого была произведена инсерция кассеты Sm/Sp-резистентности в сайт для *Sma*I (плазмида pAG13).

На следующем этапе полученную конструкцию переклонировали в вектор pJQ200mp19. Для этого осуществили рестрикцию pAG13 по сайтам для *Eco*RI и *Pst*I. Нужный фрагмент (ок. 4000 п.н.) элюировали из геля и после очистки обрабатывали Pfu-полимеразой с целью элиминации липкого конца, образованного рестриктазой *Eco*RI. Это обусловлено невозможностью клонирования в pJQ200mp19 по тем же сайтам, т.к. в его составе имеется два сайта для *Eco*RI, один из которых локализован в гене *sacB*. В связи с этим клонирование осуществляли в pJQ200mp19, обработанный рестриктазами *Pst*I и *Sma*I. В результате получена плазмида pAG14, которая может быть использована для направленной инактивации хромосомного гена *eca0852* $_{\text{Eca}}$.

Разрушение разветвленного пектина рассматривается рядом исследователей в качестве важного этапа утилизации пектиновых веществ пектолитическими бактериями рода Erwinia, предшествующего работе пектатлиаз и полигалактуроназ [2].

Сконструированные в ходе данной работы плазмиды pAG14 и pRG13 предназначены для направленной инактивации генов *eca0852* и *eca0804 (rhiE) Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Потенциальными продуктами этих генов являются ферменты, разрушающие компоненты разветвленного пектина: рамногалактуронан и арабиногалактан. Одним из немногих охарактеризованных у энтеробактерий ферментов этого типа является рамногалактуронатлиаза RhiE *Erwinia chrysanthemi*, инактивация которой приводит к снижению патогенных свойств этих бактерий [2], что указывает на важную роль этого фермента в процессе мацерации тканей растения-хозяина. Достаточно высокая гомология (60,1 %) гена *eca0804 (rhiE)*$_{Eca}$ с геном *rhiE*$_{Ech}$, возможно указывает и на функциональное сходство их продуктов, что предстоит выяснить на следующем этапе работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toth, I.K. Soft rot erwiniae: from genes to genomes / I.K. Toth, K.S. Bell, M.C. Holeva, P.R. Birch // Molecular Plant Pathology . – 2003. – Vol. 4, № 1. – P. 17-30.
2. Laatu, M. Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the Out system in *Erwinia chrysanthemi* / M. Laatu, G. Condemine // Journal of bacteriology. – 2003. – Vol. 185, № 5. – P. 1642-1649.
3. Pagès, S. A Rhamnogalacturonan lyase in the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome / S. Pagès, O. Valette, L. Abdou, A. Bélaïch, J.-P. Bélaïch // Journal of bacteriology. – 2003. – Vol. 185, № 16. – P. 4727-4733.

4. Barras, F. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot Erwinia / F. Barras, F. Gijsegem, A. Chatterjee // Annu. Rev. Phytopathol. – 1994. – Vol. 32. – P. 201-234.
5. Bell, K.S. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen Erwinia carotovora subsp. atroseptica and characterization of virulence factors / K.S. Bell, M. Sebaihia, L. Pritchard, M.T. Holden, L.J. Hyman, M.C. Holeva, N.R. Thomson, S.D. Bentley, L.J. Churcher, K. Mungall, R. Atkin, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, K. Clark, J. Doggett, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, H. Norbertczak, D. Ormond, C. Price, M.A. Quail, M. Sanders, D. Walker, S. Whitehead, G.P. Salmond, P.R. Birch, J. Parkhill, I.K. Toth // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2004. – Vol.101, № 30. – P. 11105-11110.
6. de Lorenzo, V. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria / V. de Lorenzo, M. Herrero, U. Jakubzik, K. Timmis // Journal of Bacteriology. – 1990. – Vol. 172. – P.6568-6572.
7. Quandt, J. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria / J. Quandt, M. Hynes // Gene. – 1993. – Vol. 127. – P. 15-21.
8. Norrander, I. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide directed mutagenesis / I. Norrander, T. Kempe, I. Messing // Gene. – 1983. – Vol. 26. – P. 101-106.
9. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер.с англ. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.

THE CREATION OF GENETIC CONSTRUCTIONS FOR INACTIVATION OF THE *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA ECA0804* AND *ECA0852* GENES.

S.A. Skobliakov, V.E. Miamin, A.G. Pesnyakevich
Bielorussian State University, Minsk, Belarus

In this study plasmids (pRG13, pAG14) for a site directed mutagenesis of the *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica eca0804* and *eca0852* genes were obtained. These genes code a rhamnogalacturonate lyase and arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase, respectively; there are exoenzymes, that are not characterised in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. The pRG13 and pAG14 plasmids are based on the pJQ200 suicide vector and will be used for insertion of the Sm casset in the *eca0804* and *eca0852* chromosomal genes by marker exchange recombination.