

А.А. СЕЧЕНИКОВ, А.Ю. МАКСИМОВ, М.А. ТИТОК

**ПЛАЗМИДЫ ГРУППЫ IncP-9 КАК ОСНОВА
ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ**

It has been shown that mutant variant of mini-replicon of IncP-9 plasmid group containing *rep*-gene and *oriV*-site can be used for molecular cloning in bacteria *Pseudomonas*. It has established that vector construction containing foreign genetic make-up (gene of nitrilase) efficiently introduced in the cells of bacteria *Pseudomonas* and characterised of structural and segregation stability.

Повсеместно распространенные бактерии рода *Pseudomonas* характеризуются уникальными системами метаболизма, обеспечивающими данным микроорганизмам поистине неограниченные возможности. В частности, псевдомонады способны синтезировать во внешнюю среду гормоны, антибиотики, сидерофоры, ферменты и ряд других биологически активных соединений, а также содержать генетические системы, определяющие деградацию широкого круга органических и неорганических субстратов [1].

В настоящее время бактерии рода *Pseudomonas* успешно используются для производства биопрепаратов, стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных растений, получения промышленно важных соединений, очистки окружающей среды от вредных загрязнений [2].

Для детального изучения структуры и функции отдельных генетических детерминант, определяющих практически значимые свойства этого разнообразнейшего рода бактерий, необходимы векторные системы молекулярного клонирования. В этом плане особый интерес представляют плазмиды группы IncP-9, способные наследоваться в широком круге грамотрицательных бактерий [3].

В основе создания векторных молекул лежит принцип получения минимизированных плазмидных репликонов (мини-репликонов), способных стабильно поддерживаться в различном генетическом окружении. Мини-репликоны плазмид группы IncP-9 включают *rep*-гены и *oriV*-сайты и в этом отношении не отличаются от других внехромосомных генетических элементов. Однако для репликации в клетках бактерий семейства *Enterobacteriaceae* данным плазмидам дополнительно требуется *parB*-ген и центромероподобная последовательность, локализованная в пределах промотора *par*-оперона [4]. Отсутствие этих функциональных единиц также негативно сказывается на стабильности наследования минимизированных плазмид группы IncP-9 в клетках бактерий рода *Pseudomonas* (утрачиваются с частотой до 99,9 %). В результате обработки плазмидной ДНК мутагеном *in vitro* (гидраксиламинном) были получены мутантные варианты мини-репликона плазмиды pBS267 группы IncP-9, способные стабильно наследоваться в бактериях *Pseudomonas* [5]. Полученные мутантные варианты представляют теоретический и практический интерес, поскольку позволяют изучить особенности механизмов наследования плазмид группы IncP-9 и использовать их в качестве векторов для молекулярного клонирования.

Целью настоящей работы явилось изучение возможности использования мутантного варианта мини-репликона плазмиды pBS267 группы IncP-9 в качестве вектора для молекулярного клонирования.

Материал и методика

В работе использовали штаммы из коллекции кафедры микробиологии БГУ: *E. coli* XL1-Blue (F':Tn10(Tc^R) *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ(*lacZ*)M15/*recA1 endA1, gyrA96*(Nal^R) *thi hsdR17* (r_K⁻m_K⁺) *glnV44 relA1 lac*), *E. coli* BW19851 (*recA, ΩRP4 tra, uidA::pir*⁺), *P. putida* NL26 (прототроф) и из коллекции ИЭГМ УрО: *P. fluorescens* C2 (прототроф, продуцент нитриказы), *P. fluorescens* OH1 (прототроф), *P. fluorescens* OH6 (прототроф). В качестве векторной молекулы использовали плазмиду pKMmob12 (коллекция кафедры микробиологии БГУ).

Бактерии выращивали в полноценной среде LB и минимальной среде M9 [6]. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара, источником углерода служила глюкоза в концентрации 0,2 %. Источниками углерода и (или) азота являлись также ацетонитрил в концентрации 0,2 %. В работе использовали коммерческий препарат канамицина и хлорамфеникола (левомецетина) в концентрации 50 мкг/мл. Изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG) и β-галактозидазу (X-Gal) производства Fermentas (Литва) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя и применяли в концентрации 0,5 мМ и 50 мкг/мл соответственно.

Манипуляции с плазмидами. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва). Рестриктию плазмидной ДНК и легирирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем (Fermentas, Литва). Продукты амплификации элюировали из агарозного геля набором DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва). Электрофоретический

анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве [7]. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ DNA Ladder Mix производства Fermentas (Литва).

Трансформацию бактерий *E. coli* проводили согласно методическим рекомендациям [7].

Перенос плазмиды в бактерии *Pseudomonas* осуществляли методом конъюгации. Для этого клетки донорных и реципиентных бактерий, находящиеся в стационарной фазе роста, сгущали в 5 раз, смешивали в соотношении 1:1 и смесь наносили на стерильные мембранные фильтры (Synpro 6, размер пор 0,45 мкм), помещенные на поверхность полноценной агаризованной среды в чашках Петри. Скрещиваемые бактерии инкубировали в течение 18 ч при 28 °С, после чего клетки смывали 2 мл физиологического раствора и из соответствующих разведений высевали на селективные среды. Частоты переноса плазмид определяли путем отношения числа формирующихся трансконъюгантов к общему числу клеток донора.

Стабильность наследования плазмид проверяли путем культивирования плазмидсодержащих бактерий (исходное количество составляло 10^3 кл./мл) в неселективных условиях (LB-бульоне) до стационарной фазы роста с последующим разведением и повторным культивированием до стационарной фазы роста, затем высевали на LB-агар и у сформировавшихся колоний проверяли способность расти в присутствии антибиотика (канамицина в концентрации 50 мкг/мл). Стабильность наследования определяли отношением числа клонов, выросших на среде с антибиотиком, к общему числу проверенных клонов, выраженным в процентах.

Структурную стабильность векторной молекулы, содержащей ген нитриказы, проверяли путем выделения ее из клеток бактерий *P. putida* NL26 с последующим введением ее в бактерии XL1-Blue, из которых плазмиду выделяли и подвергали рестрикции.

Тотальную ДНК выделяли с использованием GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit производства Fermentas (Литва).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для проведения ПЦР использовали набор реактивов производства Fermentas (Литва). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 1 ед. полимеразы, 200 мкМ каждого праймера, 200 мкМ дНТФ, 1,5 мМ $MgCl_2$, 3 % глицерина и буфер согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Праймеры для ПЦР. Для амплификации гена нитриказы размером 1110 п. н. использовали прямой праймер TCC CCC GGG GGA GGA AAC AAA GAT GGT TTC GTA TAA CAG C и обратный ACG CGT CGA CCT ACT TTG CTG GGA CCG, содержащие на 5'-концах сайты SmaI, RBS и SalI соответственно. Режим амплификации: 94 °С – 5 мин (1 цикл); 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин; 72 °С – 5 мин (1 цикл).

Результаты и их обсуждение

Ранее в результате функционального анализа мутантных мини-репликонов плазмиды pBS267 группы IncP-9 было установлено, что наибольшей стабильностью в клетках бактерий *Pseudomonas* и наибольшей копияностью характеризуется вариант pKMmob12 [5]. Это обосновало возможность использования данной плазмиды в качестве вектора для молекулярного клонирования. С целью характеристики векторной конструкции в ее состав встроили ген нитриказы бактерий *P. fluorescens* C2. Данный штамм характеризуется высокой нитриказной активностью и является перспективным продуцентом в производстве акриловой кислоты в промышленных масштабах [8]. Для клонирования использовали продукт амплификации гена нитриказы размером 1110 п. н., полученный с помощью праймеров, содержащих соответственно на 5'-концах сайты SmaI, RBS и SalI. Продукт амплификации чистили и подвергали рестрикции ферментами SmaI и SalI и легировали с вектором pKMmob12, предварительно обработанным теми же рестриктазами. Легированной смесью трансформировали бактерии *E. coli* XL-1. Трансформанты высевали на селективную среду, содержащую IPTG, X-gal и канамицин в концентрации 50 мкг/мл. Из окрашенных в белый цвет трансформантов (встраивание гена нитриказы в полилинкер плазмиды pKMmob12 нарушало экспрессию *lacZ*-гена) выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали обработке рестриктазами SmaI, SalI и KpnI. В результате были отобраны искомые гибридные конструкции со встроенным геном нитриказы (1110 п. н.). Один из таких вариантов обозначен как pKMN4.

Полученная конструкция pKMN4 была трансформирована в бактерии штамма *E. coli* BW19851, содержащего *tra*-гены плазмиды широкого круга хозяев RP4 в составе бактериальной хромосомы и, следовательно, способного обеспечивать конъюгационный перенос исследуемой плазмиды. В резуль-

тате конъюгационных скрещиваний было установлено, что плазида рКМN4 передается в клетки бактерий *Pseudomonas* с достаточно высокой частотой (табл. 1).

Таблица 1

Частота переноса плазмиды рКМN4 в клетки бактерий *Pseudomonas*

Донор	Реципиент	Частота переноса плазмиды рКМN4
<i>E. coli</i> BW19851/ рКМN4	<i>Pseudomonas</i> sp. ЛН4	$2,6 \times 10^{-1}$
	<i>P. fluorescens</i> ОН1	$4,1 \times 10^{-3}$
	<i>P. fluorescens</i> ОН6	$8,4 \times 10^{-3}$
	<i>P. putida</i> NL26	$2,5 \times 10^{-4}$

Примечание. В качестве селектируемого маркера использовали канамицин в концентрации 50 мкг/мл, а в качестве контрселектируемого маркера – хлорамфеникол в концентрации 50 мкг/мл.

Полученные трансформанты были проверены на способность использовать ацетонитрил в качестве источника углерода и (или) азота. Утилизация данного соединения могла свидетельствовать в пользу экспрессии гена нитриказы, клонированного в составе вектора рКМN4. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, на среде с ацетонитрилом в качестве источника азота росли все плазмидо-содержащие штаммы. Способность утилизировать ацетонитрил в качестве источника углерода, одновременно углерода и азота была выражена гораздо слабее. Полученные результаты являются предварительными и не позволяют судить о количественном выражении гена нитриказы в клетках бактерий *Pseudomonas*, отличных от исходного хозяина *P. fluorescens* C2. Тем не менее можно заключить, что клонированный ген нитриказы (клонирован под *lac*-промотор) выражается в чужеродном генетическом окружении. Низкая эффективность сконструированных бактерий использовать ацетонитрил в качестве источника углерода и энергии может быть обусловлена несколькими причинами. В частности, *lac*-промотор не обеспечивает экспрессию гена нитриказы на уровне, характерном для собственного промотора; для высокого уровня экспрессии необходимы дополнительные регуляторные элементы, которых нет в исследованном генетическом окружении; отсутствует индукция для экспрессии, которая может быть достигнута путем многократного пассирования клеток на среде с ацетонитрилом и др. Следует отметить, что выяснение механизмов наблюдаемого явления представляется весьма важным, поскольку позволит не только изучить особенности генетической организации природных бактерий *P. fluorescens* C2, характеризующихся высокой нитриказной активностью, но и в полной мере манипулировать данной генетической детерминантой в клетках исходного хозяина для улучшения его практически важных свойств.

Таблица 2

Способность плазмидосодержащих бактерий *Pseudomonas* использовать ацетонитрил в качестве источника углерода и (или) азота

Штамм	Способность использовать ацетонитрил в качестве источника		
	углерода	азота	углерода и азота
<i>P. sp.</i> ЛН4	–	–	–
<i>P. sp.</i> ЛН4/рКМN4	–/+	+	–/+
<i>P. fluorescens</i> ОН1	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> ОН1/рКМN4	–/+	+	–/+
<i>P. fluorescens</i> ОН6	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> ОН6/рКМN4	+/-	+	+/-
<i>P. putida</i> NL26	–	–	–
<i>P. putida</i> NL26/рКМN4	+/-	+	+/-
<i>P. fluorescens</i> C2	+	+	+

Примечание. «+» – Ярко выраженный рост; «+/-» – слабый; «-/+» – едва заметный.

Общеизвестно, что определяющими свойствами векторных молекул являются стабильность их наследования в ряду поколений и отсутствие рекомбинационных перестроек, приводящих к изменениям последовательностей клонированного чужеродного генетического материала (структурная стабильность). В связи с этим на следующем этапе работы были изучены данные свойства плазмиды рКМN4.

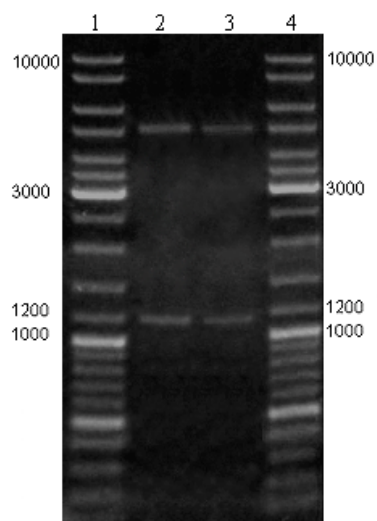
Стабильность наследования плазмиды рКМN4 проверялась путем выращивания бактерий в неселективной среде до достижения стационарной фазы роста. Причем вначале плазмидосодержащие бактерии в количестве 10^3 клеток вносили в полноценную жидкую среду и выращивали до стационарной

фазы роста, затем культуру разводили в 10^4 раз и опять выращивали до стационарной фазы роста. При этом каждый раз из культуры в стационарной фазе роста производили высеив и проверку на наличие маркера, детерминируемого плазмидой (канамицинрезистентность) путем переноса на среду с канамицином методом реплик. В результате этих экспериментов была проверена стабильность наследования плазмиды рKMN4 в неселективных условиях в течение более 40 поколений. Как видно из данных, приведенных в табл. 3, плазмида достаточно стабильно поддерживалась в исследованных бактериях *Pseudomonas* (стабильность наследования составляла 85–94 %). Полученные данные свидетельствуют о том, что выращивание плазмидсодержащих бактерий может осуществляться без добавления селективного маркера (в данном случае канамицина). Стабильность наследования векторной молекулы в отсутствие селекции является важной характеристикой и обосновывает возможность ее использования для практических целей.

Таблица 3

Стабильность наследования плазмиды рKMN4 в бактериях *Pseudomonas*

Штамм	Стабильность плазмиды рKMN4, %	
	через ~ 20 поколений	через ~ 40 поколений
<i>P. putida</i> NL26	94	93
<i>P. sp.</i> ЛН4	93	94
<i>P. fluorescens</i> ОН1	85	86
<i>P. fluorescens</i> ОН6	90	91



Электрофореграмма продуктов рестрикции плазмиды рKMN4: дорожки: 2 – плазмида рKMN4 поддерживалась только в клетках *E. coli*, 3 – плазмида рKMN4 поддерживалась в бактериях *Pseudomonas* и *E. coli*; 1 и 4 соответствуют реперу 1 kb Mix (числа указывают размер фрагментов в парах нуклеотидов, образующихся в результате электрофоретического фракционирования молекул реперной ДНК)

Не менее важной характеристикой векторов является их структурная стабильность. Рекомбинационные события, изменяющие структуру векторной молекулы, могут приводить к нарушениям последовательности встроенного генетического материала и, следовательно, к отсутствию экспрессии клонированных генов. Для анализа структурной стабильности плазмиды рKMN4 была выделена из клеток бактерий *P. putida* NL26 и трансформирована в бактерии *E. coli* XL-1, из которых плазмидную ДНК выделили и обработали одновременно рестриктазами *Sma*I и *Sal*I. Как видно из рисунка, плазмидная ДНК из бактерий *E. coli* XL-1 соответствовала по структуре исходной плазмиде рKMN4.

Таким образом, вектор рKMmob12 со встроенным геном нитриказы стабильно наследуется в ряду клеточных поколений, сохраняет свою структуру и может быть использован для анализа экспрессии данной генетической детерминанты в чужеродном генетическом окружении.

1. Silby M. W., Winstanley C., Godfrey S. A. et al. // FEMS Microbiol Rev. FEMS Microbiol Rev. 2011. Vol. 35. № 4. P. 652.

2. Боронин А. А. // СОЖ. 1998. № 10. С. 25.

3. Greated A., Titok M. A., Krasowiak R. et al. // Microbiol. 2000. Vol. 146. № 9. P. 2249.

4. Sevastyanovich Y. R., Titok M. A., Krasowiak R. et al. // Mol. Microbiol. 2005. Vol. 57. № 3. P. 819.

5 Сечеников А. А., Титок М. А. // Докл. НАН Беларуси. 2011. Т. 55. № 2. С. 70.

6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.

7. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York, 1989.

8. Забазная Е. Б., Козулин С. В., Воронин С. П. и др. // Прикл. биохимия и микробиология 1998. Т. 34. № 4. С. 377.

Поступила в редакцию 07.12.11.

Артём Андреевич Сечеников – магистрант кафедры микробиологии.

Александр Юрьевич Максимов – старший научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН.

Марина Алексеевна Титок – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии.