

- осушения // Эколого-биологические исследования растительных сообществ. Мн.: Наука и техника, 1975. С. 197–214.
6. Поликсенова В. Д., Кобзарева В. С., Кориняк С. И. Патогенные грибы на культивируемых лекарственных растениях // Вестн. Белор. ун-та. Сер. 2. 2000. № 3. С. 57–60.
7. Саутин В. И. Методические принципы определения урожаев и ресурсов дикорастущих ягод // Лесное хозяйство. 1984. № 6. С. 13–15.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА *HRPL* БАКТЕРИИ *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*.

Т. В. Овчинникова

Бактерия *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* относится к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Erwinia*. Среди представителей рода *Erwinia* имеются патогены важных сельскохозяйственных культур; *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* вызывает заболевание черную ножку картофеля.

Для многих патогенов растений, животных и человека было показано наличие у них системы секреции III типа, участвующей во взаимодействии бактерии с эукариотическим организмом-хозяином или симбионтом и служащей для направленной доставки белков в межклеточное пространство или цитоплазму клеток хозяина [5].

Рост в межклеточном пространстве растения индуцирует у фитопатогенных бактерий экспрессию генов *hrp*-кластера, кодирующего компоненты системы секреции III типа и эффекторные белки, а для того, чтобы преодолеть защитные механизмы растений и колонизировать их межклеточное пространство, бактерии продуцируют большое число факторов вирулентности. Наиболее изученными факторами вирулентности являются экзоферменты, такие как пектиназы, целлюлазы, протеазы.

Гены *hrp*-кластера располагаются на хромосоме или плазмиде компактно и образуют «острова патогенности». Как правило, эти острова имеют в своем составе несколько транскрипционных единиц; гены организованы в опероны. «Острова патогенности» имеют специфические черты, предполагающие возможность их распространения среди микроорганизмов путем горизонтального переноса.

По строению *hrp*-кластера все фитопатогены делятся на две большие группы [3]. Внутри каждой группы наблюдается сходство в расположении генов на хромосоме и наличие одинаковых регуляторных механизмов. По строению *hrp*-кластера *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) относится к первой группе, так же как и другие фитопатогены родов *Erwinia* и *Pseudomonas*.

Белки, кодируемые системой секреции III типа подразделяются на несколько типов. Среди белков имеются: очень консервативные структурные белки, имеющие сходство с белками аппарата сборки жгутиков (Hrc-белки) [4], менее консервативные регуляторные и специфические структурные белки называются Hrp-белки [4], эффекторные белки, которые транспортируются через аппарат секреции III типа в межклеточное пространство или в цитоплазму клеток хозяина, их было предложено обозначать Hoi [1]. В последнее время в связи с успехами биоинформатики при анализе геномов фитопатогенов были охарактеризованы нуклеотидные последовательности, предположительно являющиеся компонентами *hrp*-кластера. Функция белков, кодируемых этими гипотетическим генами, точно неизвестна, однако, так как по аминокислотной последовательности они напоминают эффекторные белки, их было предложено обозначать Hoi.

Hrp-гены начинают экспрессироваться, когда бактерии попадают в растения или растут на среде, имитирующие условия межклеточного пространства растений. Хотя со времени обнаружения системы секреции III типа прошло уже достаточно много времени, изменения каких именно факторов внешней среды запускают экспрессию *hrp*-кластера, до сих пор неясно [6].

У *Esa* регуляция экспрессии генов *hrp* кластера осуществляется на разных уровнях. Были описаны многие регуляторные каскады, конечной целью всех этих регуляторных каскадов является белок HrpL, кодирующий сигма-фактор. Последовательности, узнаваемые этим сигма-фактором, были охарактеризованы во всех оперонах *hrp*-кластера, кодирующих структурные и эффекторные белки. Как было отмечено, при отсутствии HrpL не происходит экспрессии компонентов системы секреции III типа.

HrpL является альтернативным сигма-фактором и показывает значительное структурное сходство с другими представителями данной группы сигма-факторов [7]. Особенностью их является то, что они появляются при индукции какими-то внешними сигналами. Однако для HrpL еще неизвестно, какие внешние факторы вызывают индукцию и в связи с этим возникают трудности в изучении системы секреции *in vitro* [2]. Для преодоления этих трудностей нами был сконструирован штамм с управляемой экспрессией *hrpL*. Работа по получению штамма состояла из нескольких этапов.

1. Амплификация при помощи ПЦР фрагмента хромосомной ДНК штамма *Esa* 3–2, содержащего *hrpL*.

2. Клонирование полученного фрагмента в мультикопийный вектор pUC18.
3. Подтверждение правильности полученной конструкции путем частичного определения нуклеотидной последовательности рекомбинантной плазмиды.
4. Трансформация различных штаммов *Eca* полученными рекомбинантными плазмидами.

Для осуществления первого этапа клонирования были сконструированы праймеры на основании уже охарактеризованных нуклеотидных последовательностей *Eca* и информации, содержащейся в базах данных. Фрагмент хромосомной ДНК *Eca* был амплифицирован и обработан рестрицирующими эндонуклеазами SacI и PstI, сайты узнавания для которых были введены в праймеры при их дизайне. Теми же рестрицирующими эндонуклеазами был обработан и вектор. Разрезанные фрагменты ДНК смешивались и лигировались. Полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали штамм *E. coli* XL-1 Blue. Трансформированные клетки высевались на питательную среду с ампициллином и X-Gal. Так как вставка была клонирована по сайтам узнавания ферментов, содержащихся в полилинкере плазмиды pUC18, находящемся в *lacZ* гене, то на среде с X-Gal отбирались клоны, имеющие белую окраску.

В результате были отобраны клоны, предположительно содержащие вставку. ДНК из этих клонов была подвергнута процедуре анализа нуклеотидной последовательности. Сравнение полученной нуклеотидной последовательности с последовательностями базы данных подтвердило предположение о том, что клонированный фрагмент содержит ген *hrpL* (Рис. 1).

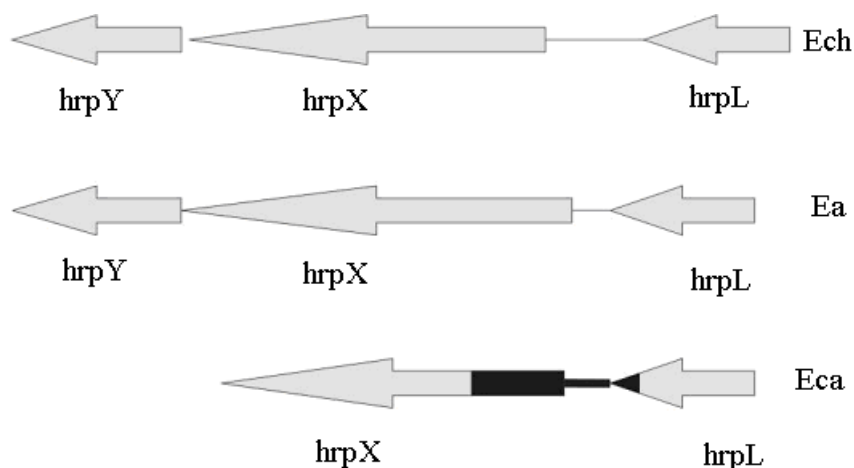


Рис.1 Фрагменты карты *hrp*-кластеров *Erwinia chrysanthemi* (Ech), *Erwinia amylovora* (Ea), *Erwinia carotovora* (Eca).

Участок клонированного фрагмента с определенной нуклеотидной последовательностью выделен черным цветом.

Для того чтобы определить нуклеотидную последовательность гена *hrpL* целиком, плазмидную ДНК штамма рHrpL3 подвергали действию рестрицирующих эндонуклеаз BstEII и EcoRI, вырезающих из клонированного фрагмента участок с уже определенной нуклеотидной последовательностью длиной примерно 500 п. н. Были повторены операции по клонированию и получена рекомбинантная плазмида рHrpL3sh.

Для изучения экспрессии генов *hrp*-кластера исходной рекомбинантной плазмидой рHrpL3 были трансформированы штаммы *Eca* JN42, JN501. Полученные трансформанты проверялись на наличие рекомбинантной плазмиды с помощью ПЦР. Отобранные клоны с рекомбинантной плазмидой высевались в полноценную жидкую питательную среду LB с IPTG для индукции генов *hrp*-кластера. Из полученной биомассы клеток выделялась мембранная фракция тотального белка, который использовался для изучения экспрессии генов *hrp*-кластера.

Был проведен предварительный эксперимент по сравнительной оценке количества белка HrpJ, к которому ранее были получены антитела, с помощью вестерн-блоттинга в индуцированных и неиндуцированных штаммах с рекомбинантными плазмидами, в штамме JN42. Однако примененная методика детекции белка HrpJ на мембране с использованием орто-дианизидина оказалась недостаточно чувствительной для детекции HrpJ в клетках *Eca* 3–2. HrpJ детектировался только в культурах *E. coli*, экспрессирующих этот белок под контролем промотора фага T7.

Литература

1. Alfano J. R., Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death // J Bacteriol. 1997. V.179. P. 5655–62.
2. Chatterjee A., Cui Y., Chaudhuri S., and Chatterjee A. K. Identification of regulators of *hrp/hop* genes of *Erwinia carotovora* ssp *carotovora* and characterization of HrpL(Ecc) (SigmaL(Ecc)), an alternative sigma factor // Molecular Plant Pathology. 2002. V.3. P. 359–370.
3. Collmer A. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria // Curr Opin Plant Biol. 1998. V.1. P. 329–35.
4. Hueck C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants // Microbiol Mol Biol Rev. 1998. V.62. P. 379–433.
5. Preston G. M., Bertrand N. and Rainey P. B. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25 // Mol Microbiol. 2001. V.41. P. 999–1014.
6. van Dijk K., Fouts D. E., Rehm A. H., Hill A. R., и др. The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner // J Bacteriol. 1999. V.181. P. 4790–7.
7. Wei Z. M., Beer S. V. *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors // J Bacteriol. 1995. V.177. P 6201–10.