

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *acdS*-ГЕНА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* B-37

А. А. МЕЛЬНИКОВА¹⁾, С. И. ЛЕОНОВИЧ¹⁾, Е. А. ХРАМЦОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

С помощью полимеразной цепной реакции осуществлен скрининг коллекции бактерий рода *Pseudomonas* на наличие гена *acdS*, кодирующего фермент АЦК-деаминазу. Отмечается, что данный фермент является ингибитором синтеза стрессового этилена, пагубно влияющего на рост и развитие растений. У трех (*P. putida* B-37, *P. putida* B-28 и *P. putida* КТ 2442) из пяти исследованных штаммов ризосферных бактерий обнаружен ПЦР-продукт необходимого размера (около 1000 пар нуклеотидов). Определена первичная нуклеотидная последовательность изучаемого фрагмента бактерий *P. putida* B-37, проведен ее анализ *in silico*. Сделан вывод о том, что данная последовательность соответствует *acdS*-гену, который кодирует полноценный функциональный белок, являющийся АЦК-деаминазой. Использование АЦК-деаминазы позволит снизить уровень стрессового этилена и уменьшить негативное влияние, оказываемое на растения различными факторами окружающей среды.

Ключевые слова: АЦК-деаминаза; этилен; *acdS*-ген; *Pseudomonas*.

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF *acdS* GENE OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* B-37

A. A. MELNIKAVA^a, S. I. LEANOVICH^a, A. A. KHRAMTSOVA^a

^aBelarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus

Corresponding author: A. A. Melnikava (alesiamelnikava@gmail.com)

In current work PCR-screening of bacterial collection of genus *Pseudomonas* was made with the purpose to check the presence of *acdS* gene which is coding enzyme ACC deaminase. ACC deaminase can inhibit synthesis of stress ethylene that is harmful for the growth and development of plants. This gene was observed among three of five bacterial strains (*P. putida* B-37, *P. putida* B-28, *P. putida* КТ 2442). Nucleotide sequence of the fragment corresponding to *acdS* gene of *P. putida* B-37 was taken and analyzed *in silico*. As a result, it was proven that there is *acdS* gene and it codes the protein ACC deaminase. Using of ACC deaminase will lead to increasing of stress ethylene level and negative influence on the plants of different environmental factors.

Key words: ACC deaminase; ethylene; *acdS* gene; *Pseudomonas*.

Образец цитирования:

Мельникова А. А., Леонович С. И., Храмцова Е. А. Молекулярно-генетический анализ *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 51–57.

For citation:

Melnikava A. A., Leanovich S. I., Khrantsova A. A. Molecular-genetic analysis of *acdS* gene of *Pseudomonas putida* B-37. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 51–57 (in Russ.).

Авторы:

Алеся Андреевна Мельникова – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.

Светлана Игоревна Леонович – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.

Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Alesia Melnikava, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

alesiamelnikava@gmail.com

Sviatlana Leanovich, student at the faculty of biology.

mnemozina176@gmail.com

Alena Khrantsova, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

elena_khrantsova@inbox.ru

Введение

Являясь важным фитогормоном, необходимым для нормального метаболизма растений, этилен может отрицательно влиять на их рост и репродукцию в случае повышения его концентрации в растительных тканях, вызванного действием комплекса абиотических и биотических факторов. Это стало одной из ключевых проблем в растениеводстве [1; 2]. Снизив уровень этилена посредством включения в биохимический путь его синтеза фермента АЦК-дезаминазы, можно повысить устойчивость растений к стрессовым условиям.

Данный фермент превращает предшественника этилена (АЦК) в аммиак и α -кетобутират [3]. Поскольку у фермента АЦК-оксидазы сродство к субстрату выше, чем у АЦК-дезаминазы, для ингибирования синтеза этилена необходима сверхэкспрессия АЦК-дезаминазы [4]. За синтез этого фермента отвечает кластер генов, в котором главную роль играет ген *acdS*. Кодированный АЦК-дезаминазу ген присутствует в основном у почвенных бактерий, к которым относится род *Pseudomonas*. Перспективным подходом к решению задачи, связанной со снижением уровня стрессового этилена, является создание трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-дезаминазы (*acdS*). В свою очередь, это должно повысить урожайность рекомбинантных посевных культур.

Цель настоящей работы – выделение *acdS*-гена бактерий рода *Pseudomonas* и анализ *in silico* его первичной нуклеотидной последовательности. Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

- провести ПЦР-скрининг коллекции бактерий рода *Pseudomonas* на наличие *acdS*-гена;
- установить первичную нуклеотидную последовательность *acdS*-гена;
- осуществить его анализ *in silico*.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Основным объектом изучения являлся бактериальный штамм *P. putida* В-37. Кроме того, использовались бактериальные штаммы *P. fluorescens* ВКМВ 8305, *P. putida* КТ 2442, *P. mendocina* ВКМВ 1299, *P. putida* В-27, *P. putida* В-28, *P. putida* М и *Escherichia coli* X1-1 Blue, полученные из коллекции научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики биологического факультета БГУ.

Выделение хромосомной ДНК. Выделение и очистка препарата хромосомной ДНК бактерий *P. putida* В-37 осуществлялись в соответствии с протоколом щелочного лизиса, предложенным Дж. Мармуром [5].

Амплификация *acdS*-гена. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась посредством аппарата C1000 Touch™ Thermal Cycler фирмы *Bio-Rad Laboratories* (США) с использованием вырожденных к *acdS*-гену праймеров: прямого Fatg 5'-tcggatccatgaacctgaatcggtttraacgttatc-3' и обратного Rtgа 5'-tccggatccctcagccgttgccgraacargaag-3'. Применялись реагенты для ПЦР компании *Fermentas* (Литва), содержащие Taq-полимеразу, 10x Taq-буфер для ПЦР, смесь дНТФ (нуклеозидтрифосфат) и деионизированную воду в концентрациях, предложенных производителем. Реакцию проводили в объеме 10 мкл. Параметры амплификации включали в себя следующие условия: 1 цикл – 5 мин при 94 °С; 35 циклов – 30 с при 94 °С, 30 с при 54 °С и 30 с при 72 °С; 1 цикл – 30 с при 72 °С.

Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей. Анализ гомологии изучаемого гена с последовательностями *acdS*-генов других представителей рода *Pseudomonas* осуществлялся программой BLAST, доступной на портале Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), с использованием алгоритма Nucleotide blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Аминокислотная последовательность белка, кодируемая изучаемым геном, определялась в программе Translate на платформе ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>).

Функциональный анализ проводился с помощью программ Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), InterProScan sequence search (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) и Motif scan (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>).

Характеристика белков (молекулярная масса, аминокислотный состав, индекс нестабильности белка, алифатический индекс, GRAVY-индекс), кодируемых исследуемым геном и *acdS*-генами других представителей рода *Pseudomonas*, была получена с помощью программы ProtParam на портале ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Вторичные структуры на аминокислотной последовательности изучаемого гена вычислены в программе SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html).

Выравнивание и построение филограммы осуществлялись с помощью пакета функций программы MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (<http://www.megasoftware.net/>).

Трехмерное изображение белка создавалось с помощью программы ProMod3 Version 1.0.2. на сервере SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Теоретическая локализация белка была определена с помощью программы TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

Результаты исследования и их обсуждение

Скрининг коллекции на наличие гена *acdS*. На первом этапе был проведен скрининг коллекции ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* на наличие гена, кодирующего АЦК-деаминазу, с использованием ПЦР. Согласно литературным данным, такой ген был выделен у многих почвенных ризобактерий. Он содержит открытую рамку считывания (ОРС) размером 1017 пар оснований (п. о.), кодирующую около 338 аминокислотных остатков (а. о.) [6]. Таким образом, ПЦР-продукт ожидаемого размера (около 1000 п. о.) был получен у бактерий *P. putida* В-37, *P. putida* В-28 и *P. putida* КТ 2442. Для дальнейшей работы, связанной с молекулярно-генетической характеристикой *acdS*-гена, был взят штамм *P. putida* В-37, который является перспективным объектом биотехнологии, поскольку обладает высокими темпами роста, способен расти в широком диапазоне температур и на различных субстратах, а кроме того, представляет собой широко распространенный ризосферный микроорганизм и имеет наибольшую ростостимулирующую активность из всех указанных штаммов.

Анализ нуклеотидной последовательности. Было проведено секвенирование фрагмента, соответствующего по размеру *acdS*-гену, в целях определения и дальнейшего анализа первичной нуклеотидной последовательности. Установлено, что нуклеотидная последовательность гена, выделенного из бактерий *P. putida* В-37, имеет высокую степень гомологии с последовательностями *acdS*-генов других представителей бактерий рода *Pseudomonas* sp. (табл. 1). По результатам выравнивания ее идентичность с *acdS*-геном бактерий *P. fluorescens* достигла 91 %.

Таблица 1

Результат поиска гомологии гена *P. putida* В-37 с *acdS*-генами изученных бактерий рода *Pseudomonas* sp. в базе данных NCBI с использованием программы BLAST

Table 1

Result of searching of homology between *P. putida* В-37 gene and *acdS* genes of investigated bacteria *Pseudomonas* sp. in data bank NCBI using BLAST program

Гомолог	Идентификационный номер в базе данных GeneBank	Выравнивание, %	E-value	Идентичность, %
Ген АЦК-деаминазы (<i>acdS</i>) и регулятора транскрипции (<i>acdR</i>) <i>P. fluorescens</i> штамм 2P24	EF635249.1	100	0,0	91
Ген АЦК-деаминазы <i>P. fluorescens</i>	U37103.1	100	0,0	91
Ген АЦК-деаминазы <i>P. putida</i> штамм AS1.1003	EU700088.1	100	0,0	90
Ген АЦК-деаминазы <i>P. fluorescens</i> штамм KACC 10070	JQ646055.1	100	0,0	89
Ген АЦК-деаминазы <i>Pseudomonas</i> sp. штамм PNSL	DQ830987.1	100	0,0	89
Ген АЦК-деаминазы <i>Pseudomonas</i> sp. штамм CH-GRS8	EF581137.1	100	0,0	89
Ген АЦК-деаминазы <i>P. fluorescens</i> штамм FY32	FJ465155.1	100	0,0	87
Ген АЦК-деаминазы <i>P. entomophila</i> штамм PS-PJH	FJ882923.1	100	0,0	86
Ген АЦК-деаминазы <i>P. putida</i> штамм UW4	AY823987.1	100	0,0	86

Выделенный из *P. putida* В-37 *acdS*-ген включает в себя 1017 пар нуклеотидов (п. н.), содержание ГЦ-пар (гуанин и цитозин) составляет 59 %. Уникальные сайты рестрикции, обнаруженные на последовательности анализируемого гена, представлены на рис. 1.

Анализируемая нуклеотидная последовательность содержит в себе ОРС, которая начинается с AUG-кодона на позиции 1–3-го нуклеотидов и заканчивается терминирующим кодоном на позиции 1015–1017-го нуклеотидов. Данная ОРС кодирует полипептид длиной 338 а. о. с молекулярной массой, равной 36,18 кДа.

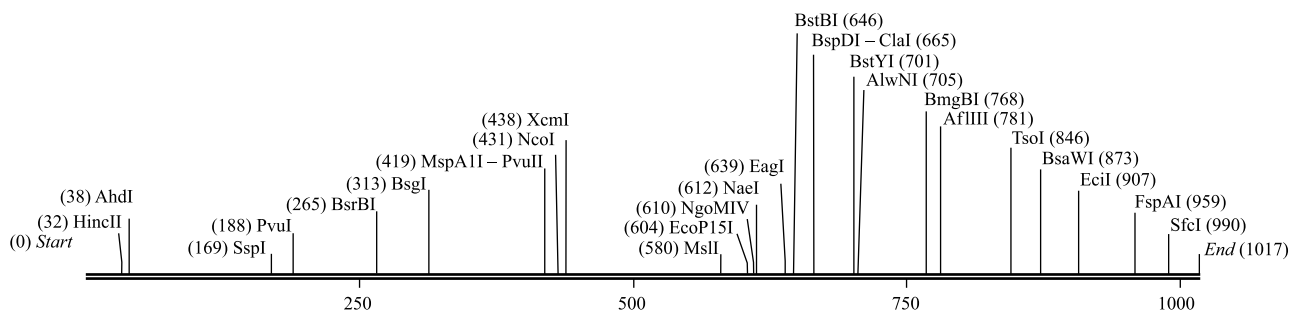


Рис. 1. Рестрикционная карта *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37, построенная с помощью программы SnapGene (<http://www.snapgene.com/>)

Fig. 1. Restriction map of *acdS* gene *P. putida* B-37, constructed with SnapGene program (<http://www.snapgene.com/>)

Функциональный анализ. В белке, кодируемом геном *acdS* бактерий *P. putida* B-37, выявлено присутствие консервативного домена, который соответствует ACCD-домену (структурная и функциональная единица АЦК-деаминазы), относящемуся к суперсемейству β -триптофан синтаз II типа фолдинга (идентификационный номер в базе данных NCBI – cl00342).

При анализе аминокислотной последовательности с помощью программы InterProScan sequence search также были выявлены пиридоксаль-связывающие сайты, относящиеся к консервативным сайтам связывания, необходимым для функционирования фермента АЦК-деаминазы, а именно: Lys⁵¹, Tyr²⁹⁴, Ser⁷⁸, Cys¹⁶² и Glu²⁹⁵ [7].

Физико-химический анализ. Фермент АЦК-деаминаза штамма *P. putida* B-37 и десять других штаммов представителей рода *Pseudomonas*, аминокислотные последовательности которых были взяты из баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и UniProt (<http://www.uniprot.org/>), характеризовались по таким физико-химическим параметрам, как молекулярный вес, теоретическая изоэлектрическая точка, общее число отрицательно и положительно заряженных аминокислотных остатков, индекс нестабильности, алифатический и GRAVY-индексы (табл. 2). Согласно полученным результатам физико-химические характеристики сходны для фермента бактерий *P. putida* B-37 и АЦК-деаминазы представителей рода *Pseudomonas*. Основываясь на численном значении GRAVY-индекса и индекса нестабильности, можно предположить, что изучаемый белок обладает гидрофильными свойствами [8] и будет стабилен при выделении его в чистом виде [9].

Таблица 2

Характеристики АЦК-деаминазы бактерий рода *Pseudomonas* sp., рассчитанные с использованием программы ProtParam на портале ExPASy

Table 2

Characteristics of ACC deaminases of genus *Pseudomonas* sp. based on results of ProtParam program on the portal ExPASy

Бактериальная природа белка	Длина, а.	Молекулярный вес, Да	Общее число отрицательно заряженных остатков (Asp + Glu), %	Общее число положительно заряженных остатков (Arg + Lys), %	Индекс нестабильности белка	Алифатический индекс	GRAVY-индекс
<i>P. putida</i> B-37	338	36718,91	12,13	10,36	38,79	85,98	−0,112
<i>P. putida</i> UW4 AY823987.1	338	36873,98	13,02	10,65	40,22	84,23	−0,187
<i>P. fluorescens</i> KACC 10070 JQ646055.1	338	36955,14	12,72	10,95	41,40	85,38	−0,176
<i>P. fluorescens</i> FY32 FJ465155.1	338	36902,03	13,02	10,65	40,69	84,53	−0,188
<i>Pseudomonas</i> sp. ACP AAA25689.1	338	36671,79	11,83	10,95	31,73	84,56	−0,149

Окончание табл. 2
Ending table 2

Бактериальная природа белка	Длина, а.	Молекулярный вес, Да	Общее число отрицательно заряженных остатков (Asp + Glu), %	Общее число положительно заряженных остатков (Arg + Lys), %	Индекс нестабильности белка	Алифатический индекс	GRAVY-индекс
<i>Pseudomonas</i> sp. CH-GRS 8 EF581137.1	338	36900,15	12,42	11,54	36,19	84,23	-0,203
<i>Pseudomonas</i> sp. PNSL ABH03031.1	338	36916,19	12,42	11,54	35,64	85,38	-0,187

Определение наличия вторичных структур. В аминокислотной последовательности *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 идентифицировано четыре класса вторичных структур, а именно: α -спирали, β -пласты, протяженные нити и случайные витки в процентном соотношении 31,95; 11,54; 21,60 и 34,91 соответственно (рис. 2).

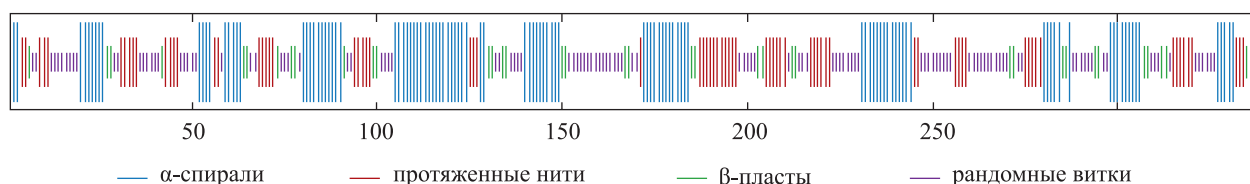


Рис. 2. Предполагаемая вторичная структура белка

Fig. 2. Proposed secondary structure of protein

Филогенетический анализ. При помощи алгоритма Neighbor-Joining Bootstrap, включающего в себя 500 *bootstrap*-повторов, проанализированы филогенетические отношения бактерий *P. putida* В-37 и других представителей рода *Pseudomonas* на основании аминокислотных последовательностей АЦК-деаминазы (рис. 3).

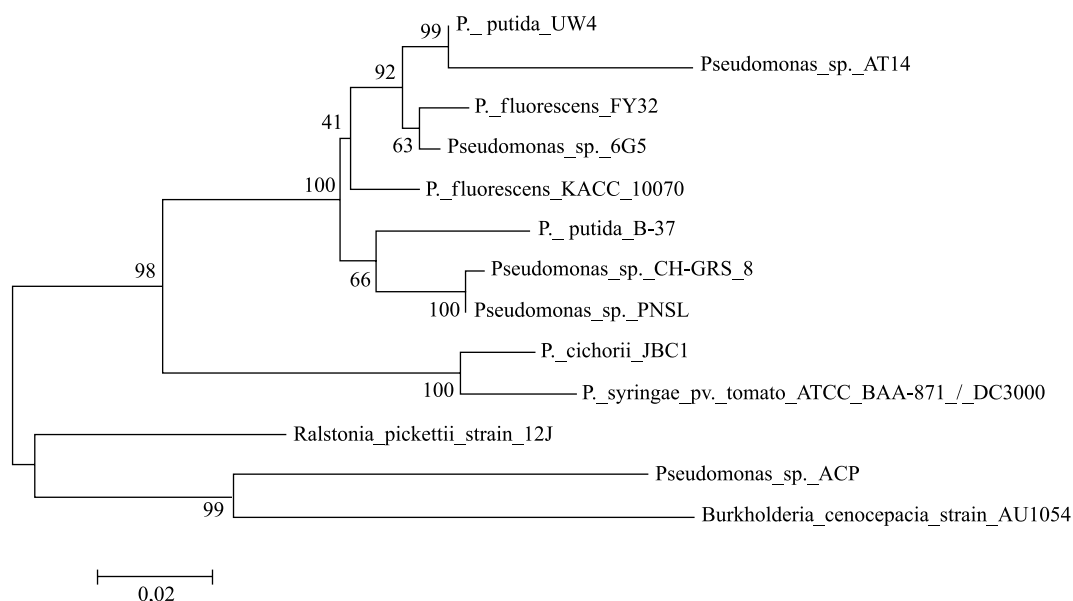


Рис. 3. Филогенетический анализ представителей рода *Pseudomonas* на основе аминокислотной последовательности АЦК-деаминазы

Fig. 3. Phylogenetic analyses of genus *Pseudomonas* based on amino acid sequence of ACC deaminase

3D-моделирование белка. По результатам анализа, проведенного с помощью программы ProMod3 Version 1.0.2, белок, кодируемый изучаемым геном бактерий *P. putida* B-37, является гомотетрамером (рис. 4). Для построения 3D-модели была взята 1tzm.1.A-модель АЦК-деаминазы, имеющая сходство с анализируемой аминокислотной последовательностью на 81,66 %.

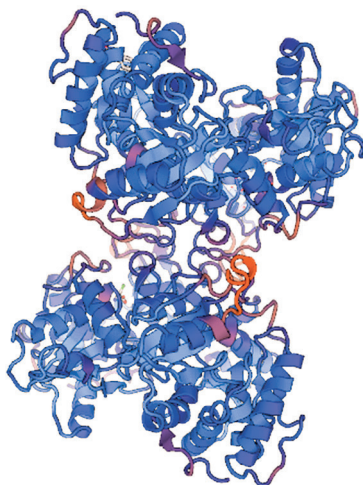


Рис. 4. Предполагаемая пространственная структура белка АЦК-деаминазы бактерий *P. putida* B-37

Fig. 4. Proposed 3D structure of ACC deaminase protein of *P. putida* B-37

На основании данных о теоретической локализации изучаемый белок предположительно является секретируемым (рис. 5).

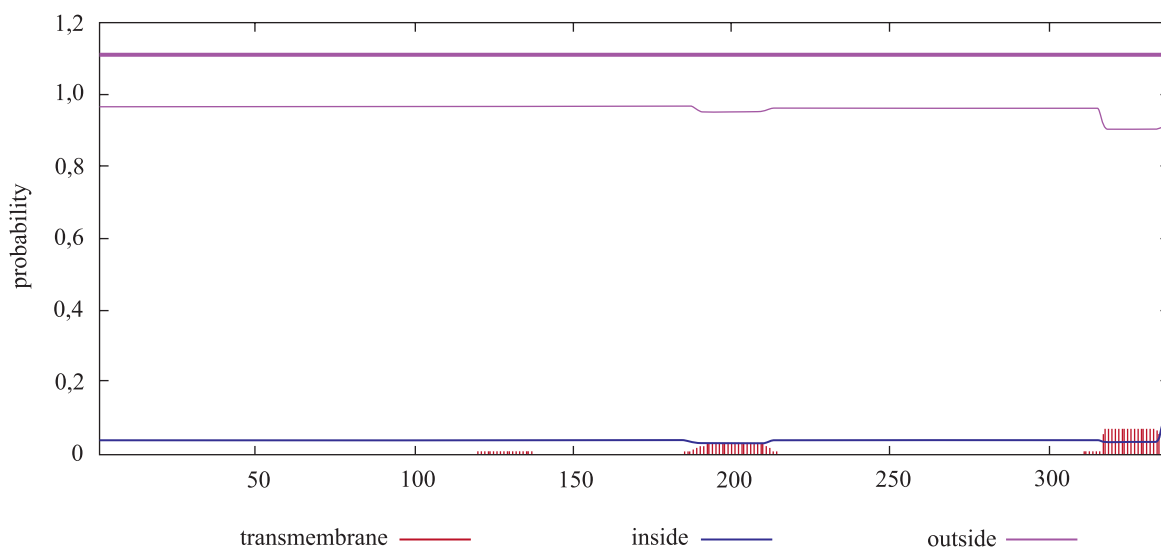


Рис. 5. Результат анализа локализации изучаемого белка

Fig. 5. Result of localization analysis of studied protein

Таким образом, полученные результаты амплификации и анализа *in silico* первичной нуклеотидной последовательности *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 позволили судить о высокой степени гомологии и родства изучаемого белка с АЦК-деаминазой других представителей рода *Pseudomonas*.

Заключение

В настоящей работе методом ПЦР осуществлен скрининг коллекции бактерий рода *Pseudomonas* на наличие гена *acdS*. У трех (*P. putida* B-37, *P. putida* B-28 и *P. putida* КТ 2442) из пяти исследованных штаммов ризосферных бактерий обнаружен ПЦР-продукт необходимого размера. Произведено

секвенирование изучаемого фрагмента бактерий *P. putida* В-37 в целях дальнейшего анализа *in silico* его первичной нуклеотидной последовательности. По итогам анализа сделан вывод о том, что данная последовательность соответствует *acdS*-гену. Этот ген кодирует полноценный функциональный белок, который является АЦК-деаминазой, и содержит необходимые сайты связывания с кофактором. Использование АЦК-деаминазы позволит снизить уровень стрессового этилена и уменьшить негативное влияние, оказываемое на растения различными факторами среды. Практическая значимость данного исследования связана с возможностью получения трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. Glick B., Todorovic B., Czarny J., et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // *Critical Rev. Plant Sci.* 2007. Vol. 26, issue 5–6. P. 227–242.
2. Gontia-Mishra I., Sasidharan S., Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress // *Biotechnol. Lett.* 2014. Vol. 36, issue 5. P. 889–898.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биология: принципы и применение; пер. с англ. М., 2002.
4. Glick B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 251, issue 1. P. 1–7.
5. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // *J. Mol. Biol.* 1961. Vol. 3. P. 208–218.
6. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration // *Bacteria in Agrobiol.: stress management* / ed. by D. K. Maheshwari. Heidelberg, 2012. P. 187–204.
7. Kamala-Kannan S., Lee K. J., Park S. M., et al. Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil // *J. Basic Microbiol.* 2010. Vol. 50. P. 200–205.
8. Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 157. P. 105–132.
9. Guruprasad K., Bhasker Reddy B. V., Pandit M. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence // *Protein Eng., Design Selection.* 1990. Vol. 4, № 2. P. 155–161.

References

1. Glick B. R., Todorovic B., Czarny J., et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Rev. Plant Sci.* 2007. Vol. 26, issue 5–6. P. 227–242. DOI: 10.1080/07352680701572966.
2. Gontia-Mishra I., Sasidharan S., Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 2014. Vol. 36, issue 5. P. 889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.
3. Glick B., Pasternak J. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. Moscow, 2002 (in Russ.).
4. Glick B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 251, issue 1. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.030.
5. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 1961. Vol. 3. P. 208–218.
6. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. *Bacteria in Agrobiol.: stress management*. Heidelberg, 2012. P. 187–204. DOI: 10.1007/978-3-642-23465-1_9.
7. Kamala-Kannan S., Lee K. J., Park S. M., et al. Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J. Basic Microbiol.* 2010. Vol. 50. P. 200–205.
8. Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 157. P. 105–132.
9. Guruprasad K., Bhasker Reddy B. V., Pandit M. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng., Design Selection.* 1990. Vol. 4, No. 2. P. 155–161.

Статья поступила в редколлегию 19.05.2017.
Received by editorial board 19.05.2017.