

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАЗМИДЫ pK18mob ДЛЯ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Е. Г. ВЕРЕМЕЕНКО¹⁾, Ю. А. ШИЛОВА¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

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

В результате исследования разработана методика сайт-направленного инсерционного мутагенеза с использованием суицидального интегративного вектора pK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*. Показано, что оптимальное соотношение клеток донора и реципиента составляет 50 : 50. Вместе с тем у бактерий *P. chlororaphis*, а также их подвидов наблюдается смещение оптимального соотношения в сторону преобладания клеток донора. Использование данной методики позволяет увеличить выход трансконъюгантов более чем в четыре раза, что существенно расширяет возможности по поиску и отбору интересующих исследователя вариантов штаммов. Установлено, что коллекционные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* обладают различными скоростями роста. Продemonстрировано, что в геномах всех исследованных штаммов присутствует ген *psrA*.

Ключевые слова: сайт-специфический инсерционный мутагенез; суицидальный интегративный вектор; генно-инженерная конструкция; трансконъюганты.

OPTIMIZATION OF METHODS OF SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS FOR *PSEUDOMONAS* BACTERIA GENUS USING pK18mob PLASMID VECTOR

E. G. VEREMEENKO^a, Y. A. SHILOVA^a, N. P. MAXIMOVA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: veremeenkokatya@yandex.ru

In the course of this study, a method for site-directed insertional mutagenesis was developed using the pK18mob suicide integral vector for bacteria of the genus *Pseudomonas*. It is shown that the optimal ratio of donor and recipient cells is 50 : 50. At the same time, in bacteria of *P. chlororaphis*, as well as their subspecies, the optimal ratio is shifted towards the predominance of donor cells. The use of this technique allows to increase the yield of transconjugants more than 4 times, which significantly expands the possibilities for searching and selecting the variants of strains of interest

Образец цитирования:

Веремеенко Е. Г., Шилова Ю. А., Максимова Н. П. Оптимизация методики проведения сайт-направленного мутагенеза с использованием плазмиды pK18mob для бактерий рода *Pseudomonas* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 56–61.

For citation:

Veremeenko E. G., Shilova Y. A., Maximova N. P. Optimization of methods of site-specific mutagenesis for *Pseudomonas* bacteria genus using pK18mob plasmid vector. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 56–61 (in Russ.).

Авторы:

Екатерина Геннадьевна Веремеенко – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Юлия Александровна Шилова – аспирантка кафедры генетики биологического факультета.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

Authors:

Katsiaryna Veremeenko, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

veremeenkokatya@yandex.ru

Yuliya Shilova, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

juliashilova1@gmail.com

Natalia Maximova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

nataliamaximova@yahoo.com

to the researcher. It was also found that the collection strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* have different growth rates. It was demonstrated that the gene *psrA* is present in the genomes of all strains studied.

Key words: site-specific insertion mutagenesis; suicide integrative vector; geno-engineering construction; trans-conjugants.

Введение

Сайт-направленный инсерционный мутагенез относится к наиболее перспективным подходам к изучению функции генов и их продуктов. Одним из интегративных суицидальных векторов, используемых для проведения сайт-направленного мутагенеза, является плаزمида pK18mob. Данный вектор имеет относительно небольшой размер – около 3 т. п. о., что облегчает его перенос в клетки реципиента. В составе плазмиды имеются гены устойчивости к антибиотикам ампициллину и канамицину, позволяющие проводить селективный отбор трансконъюгантов. В участке, где локализован ген устойчивости к ампициллину, помещен полилинкер. В данный сайт осуществляется клонирование участка гена, который собираются инактивировать. Это делается в целях создания области гомологии между плазмидой и хромосомой и обеспечивает дальнейшее встраивание плазмиды в ген посредством гомологичной рекомбинации. С обеих сторон полилинкер окружен областями, гомологичными участкам генома фага M13, что дает возможность использовать стандартные праймеры для последующего обнаружения сайта, в который внедрена генно-инженерная конструкция. Плаزمида переносится в клетки донора только путем конъюгации, что позволяет использовать ее для направленной инактивации генов у тех бактерий, у которых трансформация невозможна или затруднительна [1]. Кроме того, такой способ передачи повышает эффективность ее интеграции в геном. Данный тип клонирующих векторов обеспечивает иммобилизацию в широком диапазоне грамотрицательных и грамположительных бактерий. Как известно, большое влияние на эффективность инсерционного мутагенеза с использованием pK18mob оказывает подбор оптимальных концентраций клеток донора и реципиента, используемых в скрещивании. Следовательно, определение этих параметров – важное условие эффективной инактивации целевого гена. Большинство работ, посвященных инактивации генов с помощью вектора pK18mob, касаются бактерий родов *Xanthomonas*, *Corynebacterium* и *Rhizobium*, тогда как для бактерий рода *Pseudomonas*, представители которых являются продуцентами многих ценных биологически активных соединений, эта методика применяется достаточно редко [2].

Цель настоящей работы – подбор и оптимизация условий для проведения сайт-направленного инсерционного мутагенеза с использованием плазмиды pK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*.

Материалы и методика исследований

В работе использовали штамм *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162 из коллекции кафедры генетики БГУ (коллекционный номер ВКМВ-162), а также штаммы *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. mendocina*, *P. aureofaciens*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* B-1391, *P. corrugata* из коллекции БГУ, мобилизующий штамм *E. coli* BW19851 (*recA*, Ω RP4 *tra*, *uidA::pir+*) [3] из коллекции кафедры молекулярной биологии БГУ.

Бактерии культивировали в стандартных питательных средах: в питательной среде для антибиотиков (ПСА), предложенной в [4], питательном бульоне (ПБ), приготовленном на основе сухого концентрата, производства ФГУП «НПО «Микроген»» (г. Махачкала, Россия). Количество жизнеспособных клеток определяли методом серийных разведений путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашках Петри на агаризованной среде. Бактерии рода *Pseudomonas* культивировались при температуре 28 °С, а *E. coli* – при температуре 37 °С. Жизнеспособность клеток определяли по методу Коха.

Полимеразную цепную реакцию проводили в смеси стандартного состава [5] согласно рекомендациям производителя с использованием программируемого амплификатора Thermo HybaibPX2 (США). Параметры циклов амплификации: первичная денатурация – 1 мин при 94 °С; затем 10 циклов: денатурация – 94 °С, 30 с; отжиг – 59 °С, 30 с; элонгация – 68 °С, 1 мин; 20 циклов: денатурация – 94 °С, 30 с; отжиг – 53 °С, 30 с; элонгация – 68 °С, 1 мин; заключительная достройка – 70 °С, 5 мин. Для идентификации инсерции генно-инженерной конструкции на основе плазмиды pK18mob в область хромосомного *psrA*-гена проводили ПЦР-анализ (ПЦР – полимеразная цепная реакция) с использованием смеси полимераз Taq и Pfu и праймеров к полноразмерному гену. ПЦР-анализ на наличие генно-инженерной конструкции в составе бактериальной хромосомы осуществляли по следующей программе амплификации: первичная денатурация – 3 мин при 94 °С; затем 30 циклов: денатурация – 94 °С, 1 мин; отжиг – 55 °С, 30 с; элонгация – 68 °С, 3 мин; заключительная достройка – 68 °С, 5 мин. Использовали ПЦР-амплификатор C1000 Touch™ ThermalCycler BIO RAD (Германия).

В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы MBIFermentas (Литва).

Результаты исследований и их обсуждение

Поскольку была поставлена задача по стандартизации методик сайт-направленного мутагенеза с использованием плазмиды rK18mob для всех бактерий рода *Pseudomonas*, на следующем этапе работы проводилась проверка на наличие гена *psrA*, который был выбран в качестве мишени для инактивации, так как согласно литературным данным он должен присутствовать в геномах большинства представителей этого рода [6; 7]. Для проверки наличия данного гена в геномах коллекционных штаммов был проведен ПЦР-скрининг с использованием праймеров к данному гену. Полученные результаты представлены на рис. 1.

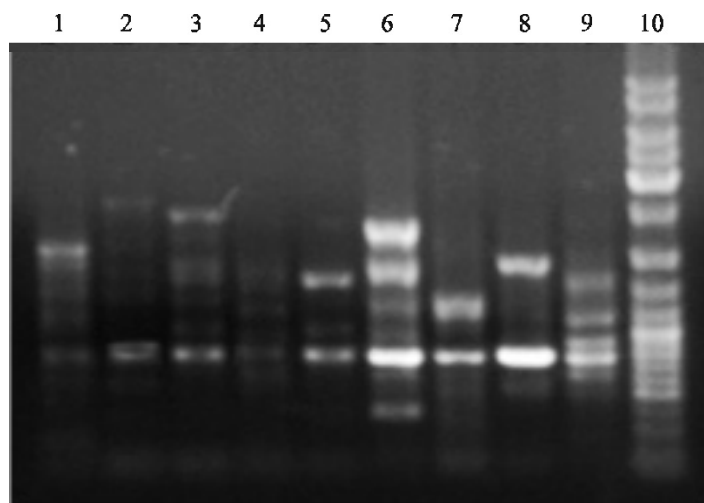


Рис. 1. Электрофоретический анализ на наличие *psrA*-гена у бактерий рода *Pseudomonas*:
1 – *P. putida*; 2 – *P. mendocina*; 3 – *P. chlororaphis aureofaciens*; 4 – *P. syringae*;
5 – B-162; 6 – *P. aeruginosa*; 7 – *P. fluorescens*; 8 – *P. chlororaphis*; 9 – *P. corrugata*;
10 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Mid Range 10 kb DNA Ladder

Fig. 1. Electrophoretic analysis for the presence of the *psrA* gene in bacteria of the genus *Pseudomonas*:
1 – *P. putida*; 2 – *P. mendocina*; 3 – *P. chlororaphis aureofaciens*; 4 – *P. syringae*;
5 – B-162; 6 – *P. aeruginosa*; 7 – *P. fluorescens*; 8 – *P. chlororaphis*; 9 – *P. corrugata*;
10 – marker of molecular weights of DNA fragments Mid Range 10 kb DNA Ladder

Из литературных источников известно, что большое влияние на эффективность инсерционного мутагенеза с использованием rK18mob оказывает подбор оптимальных концентраций клеток донора и реципиента, используемых в скрещивании. Соответственно, необходимо было подобрать такие соотношения для бактерий рода *Pseudomonas*. Однако для этого на предварительном этапе требовалось установить ростовые характеристики коллекционных штаммов *Pseudomonas* и мобилизующего штамма *E. coli* BW19851. Данные бесплазмидные штаммы предварительно были проверены на способность к росту в присутствии антибиотика канамицина, устойчивости к которому обеспечивается плазмидой rK18mob. Оказалось, что практически все штаммы, за исключением *P. aeruginosa*, проявляют высокую чувствительность к данному антибиотику. Все они, кроме устойчивого вида, были использованы в дальнейших экспериментах.

Полученные результаты продемонстрировали, что все исследованные штаммы обладают различными скоростями роста. По этому параметру данные штаммы бактерий можно условно разделить на три группы. Первая группа включает бактерии, обладающие относительно невысокими скоростями роста. В нее входят *E. coli* BW19851, *P. syringae*, *P. chlororaphis ssp. aureofaciens*, *P. mendocina*, *P. corrugata*. Ко второй группе отнесены бактерии, скорость роста которых приблизительно в два раза ниже таковой контрольного штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162. Это бактерии *P. chlororaphis* B-1391, *P. putida*. Штамм *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162, как оказалось, обладал наибольшей скоростью роста и был выделен в самостоятельную группу.

На следующем этапе работы была проведена серия экспериментов по подбору оптимальных температурных условий для осуществления конъюгации исследуемых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* и штамма *E. coli* BW19851, который использовался в качестве донора рекомбинантной плазмиды. Температуры в эксперименте варьировали от 28 °C (температура, оптимальная для реципиента) до 37 °C (температура, оптимальная для донора). В пределах проводимого опыта использовались также температуры 29, 30 и 31 °C, но в этом случае не наблюдалось образования трансконъюгантов. Показано,

что штамм *E. coli* BW19851 рос при всех температурах примерно с одинаковой интенсивностью, тогда как задержка роста *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 наблюдалась уже при 32 °C, а при 37 °C рост отсутствовал. В связи с этим для дальнейших экспериментов по скрещиванию решено было использовать температуру, оптимальную для реципиентов.

Далее, был проведен подбор оптимальных концентраций клеток донора и реципиента для всех анализируемых штаммов в целях увеличения выхода трансформантов. Полученные данные приведены в таблице.

Соотношение клеток донора и реципиента
для сайт-направленного мутагенеза с помощью плазмиды pK18mob
Proportion of donor cells and recipients
for site-directed mutagenesis using plasmid pK18mob

Штамм	Соотношение клеток донора и реципиента, мкл	Количество колоний на чашке
<i>P. putida</i>	50 : 50	11 ± 2
	40 : 60	20 ± 5
	60 : 40	31 ± 3
	70 : 30	29 ± 5
<i>P. chlororaphis ssp. aurantiaca</i> B-162	50 : 50	18 ± 1
	40 : 60	23 ± 2
	60 : 40	0
	70 : 30	36 ± 7
<i>P. mendocina</i>	50 : 50	12 ± 3
	40 : 60	22 ± 3
	70 : 30	17 ± 1
<i>P. chlororaphis aureofaciens</i>	50 : 50	20 ± 4
	40 : 60	9 ± 2
	70 : 30	2,0 ± 0,3
<i>P. syringae</i>	50 : 50	17 ± 1
	40 : 60	27 ± 3
	70 : 30	31 ± 6
<i>P. fluorescens</i>	50 : 50	32 ± 2
	40 : 60	27 ± 4
	70 : 30	25 ± 2
<i>P. chlororaphis</i> B-1391	50 : 50	13 ± 3
	40 : 60	15 ± 1
	70 : 30	19 ± 6
<i>P. corrugata</i>	50 : 50	4,0 ± 0,7
	40 : 60	21 ± 5
	70 : 30	17 ± 2

На основании результатов исследований нами была предложена методика конъюгации для бактерий рода *Pseudomonas*. Установлено, что оптимальное соотношение клеток донора и реципиента для большей части исследованных в этом отношении представителей рода *Pseudomonas* достигает почти 50 : 50. При данном соотношении и близком к нему соотношении 40 : 60 наблюдается наибольшее количество колоний трансконъюгантов у пяти из восьми исследованных штаммов. В то же время интересным оказался тот факт, что для *P. chlororaphis* B-1391 и родственного ему исследуемого штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 оптимальное соотношение «донор – реципиент» было существенно смещено в сторону преобладания клеток донора. Вследствие этого именно данное соотношение и было в дальнейшем использовано для проведения экспериментов по сайт-направленному инсерционному мутагенезу.

Продemonстрировано также, что большую роль в увеличении выхода трансконъюгантов играло совместное выдерживание клеток донора и реципиента в жидкой среде в течение 1 ч до внесения их на агаризованный питательный субстрат. Исходя из этого, была выработана следующая методика.

Первый день. Засевали ночную культуру в рыбный бульон (клетки донора и реципиента). В роли донора выступала *E. coli* BW19851.

Второй день. Измерив оптическую плотность (ОП) ночной культуры клеток при длине волны 600 нм ($ОП_{600}$), с помощью полученных ранее графиков кривых роста вычисляли концентрацию клеток донора и реципиента и затем смешивали их в соотношении 70 : 30 так, чтобы количество клеток реципиента было не менее $1 \cdot 10^9$. Смесь клеток донора и реципиента инкубировали в жидкой питательной среде в течение часа и затем после осаждения переносили на поверхность полноценной агаризованной среды в виде медальонов. Чашки инкубировали 24 ч при 28 °С.

Третий день. В чашки с полноценной агаризованной средой, содержащей 50 мкг/мл канамицина и 200 мкг/мл левомицетина (использовали для удаления клеток донора, содержащих плазмиду), с помощью шпателя высевали клетки, выросшие в медальонах. Инкубировали чашки 42 ч при 28 °С.

Пятый день. Идентификация трансконъюгантов. По разработанной методике конъюгации был проведен инсерционный мутагенез штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162. Для этого фрагмент размером 230 п. о., соответствующий центральной области гена *psrA*, был клонирован в составе суицидального интегративного вектора pK18mob для создания области гомологии мутирующей генно-инженерной конструкции с необходимым участком генома. Полученная генно-инженерная конструкция была обозначена как pK18mob230*psrA*. В результате проведения скрещивания исследуемого штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 с донорным штаммом *E. coli* BW19851, несущим генно-инженерную конструкцию pK18mob230*psrA*, было отобрано 60 трансконъюгантов. Для идентификации вставки в нужную область генома был проведен ПЦР-анализ с помощью праймеров к полноразмерному гену *psrA* (рис. 2).

В результате проведения ПЦР-анализа был получен ожидаемый фрагмент размером 4770 п. о., который соответствует размеру гена *psrA*, содержащего инсерцию вектора pK18mob230*psrA*, а также выявлено отсутствие фрагмента в 750 п. о., соответствующего полноразмерному гену. Из приведенных данных следует, что инсерция генно-инженерной конструкции произошла в требуемую область.

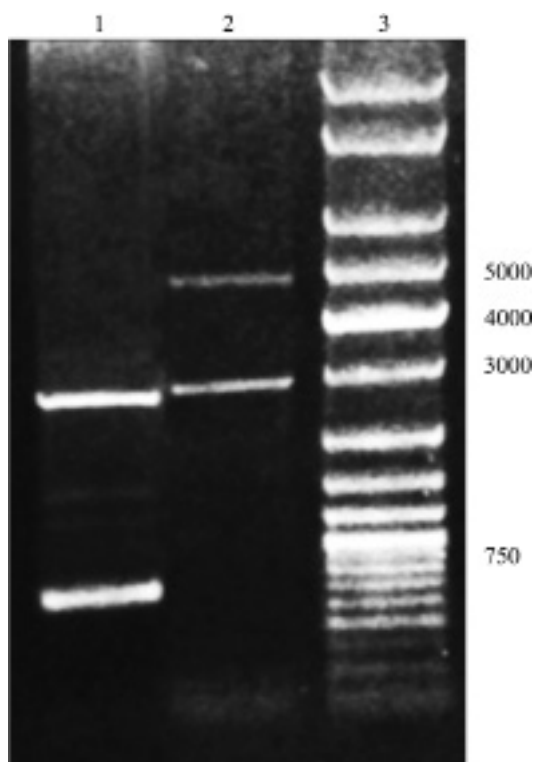


Рис. 2. ПЦР-анализ трансконъюгантов на основе *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162:
1 – штамм дикого типа B-162; 2 – рекомбинантный штамм B-162 pK18mob230*psrA*; 3 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range DNA Ladder (100 bp – 10 kb), Jena Bioscience

Fig. 2. PCR analysis of transconjugants based on *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162:
1 – wild type strain B-162; 2 – recombinant strain B-162 pK18mob230*psrA*; 3 – marker of molecular weights of DNA fragments Long Range DNA Ladder (100 bp – 10 kb), Jena Bioscience

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования были подобраны оптимальные условия проведения сайт-направленного инсерционного мутагенеза с использованием суицидального интегративного вектора рK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*. Данная методика дает возможность существенно увеличить выход трансконъюгантов (более чем в четыре раза), содержащих вставку генно-инженерной конструкции в целевой области, у представителей данного рода. Это, в свою очередь, расширяет возможности отбора штаммов с наиболее интересными фенотипическими проявлениями мутаций в данном гене, что позволяет точнее определить его функциональное значение и роль PsrA-белка в регуляции вторичного метаболизма у представителей рода *Pseudomonas*. Наличие данного гена в геномах всех исследованных в этом отношении штаммов *Pseudomonas* дополнительно подтверждает его важность для протекания биохимических процессов в клетках бактерий этого рода.

Библиографические ссылки

1. Katzen F., Becker A., Ielmini V. M., et al. New Mobilizable Vectors Suitable for Gene Replacement in Gram-Negative Bacteria and Their Use in Mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65, № 1. P. 278–282.
2. Garcia B., Olivera E. R. Strategy for Cloning Large Gene Assemblages as Illustrated Using the Phenylacetate and Polyhydroxyalkanoate Gene Clusters // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 5019–5025.
3. Metcalf W. W., Jiang W., Wanner B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. Vol. 138. P. 1–7.
4. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains // J. Bacteriol. 1970. Vol. 103, № 1. P. 16–19.
5. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York, 2001.
6. Kang Y., Lunin V. V., Skarina T., et al. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. Microbiol. 2009. Vol. 73, № 1. P. 120–136.
7. Chatterjee A., Cui Y., Hasegawa H., et al. PsrA, the *Pseudomonas* Sigma Regulator, Controls Regulators of Epiphytic Fitness, Quorum-Sensing Signals, and Plant Interactions in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Strain DC3000 // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, № 11. P. 3684–3694.

References

1. Katzen F., Becker A., Ielmini V. M., et al. New Mobilizable Vectors Suitable for Gene Replacement in Gram-Negative Bacteria and Their Use in Mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65, No. 1. P. 278–282.
2. Garcia B., Olivera E. R. Strategy for Cloning Large Gene Assemblages as Illustrated Using the Phenylacetate and Polyhydroxyalkanoate Gene Clusters. Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 5019–5025.
3. Metcalf W. W., Jiang W., Wanner B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. Gene. 1994. Vol. 138. P. 1–7.
4. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains. J. Bacteriol. 1970. Vol. 103, No. 1. P. 16–19.
5. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York, 2001.
6. Kang Y., Lunin V. V., Skarina T., et al. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 2009. Vol. 73, No. 1. P. 120–136. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06757.x.
7. Chatterjee A., Cui Y., Hasegawa H., et al. PsrA, the *Pseudomonas* Sigma Regulator, Controls Regulators of Epiphytic Fitness, Quorum-Sensing Signals, and Plant Interactions in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Strain DC3000. Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, No. 11. P. 3684–3694.

Статья поступила в редколлегию 28.11.2016.
Received by editorial board 28.11.2016.