

УДК 575:579.852.11

СПОСОБНОСТЬ К КОНЬЮГАЦИИ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КРУПНЫХ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ПРИРОДНЫХ ШТАММАХ *BACILLUS SUBTILIS* ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ ВОСТОЧНО-ЕВРОПЕЙСКОЙ РАВНИНЫ

© 2007 г. В. З. Незаметдинова*, Е. А. Федорина*, Е. У. Полуэктова*, М. А. Титок **, А. А. Прозоров*.¹

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

**Биологический факультет Белорусского государственного университета, Минск

Поступила в редакцию 30.01.2006 г.

Были изучены свойства крупных плазмид, содержащихся в штаммах *Bacillus subtilis* из почв г. Москвы и Московской области и различных регионов Республики Беларусь. Все крупные плазмиды из коллекции штаммов, собранной в Беларуси, обладали способностью к конъюгативной мобилизации мелкой плазмиды pUB110 и были однородны по величине и другим свойствам. У большинства проверенных плазмид в штаммах, выделенных из московских почв, отсутствовала способность к мобилизации; они имели разные размеры и не обнаруживали гомологии с районом репликации плазмид белорусской коллекции. Однородность плазмид, находящихся в штаммах почв из Беларуси, могла быть связана с их активным горизонтальным переносом в природных условиях.

Ключевые слова: почвенные штаммы *Bacillus subtilis*, крупные плазмиды, конъюгация.

В различных природных штаммах *Bacillus subtilis* довольно часто содержатся мелкие криптические плазмиды [1, 2]. Крупные плазмиды встречаются в этих штаммах реже. В нашем распоряжении находилась представительная коллекция природных штаммов *B. subtilis*, выделенных из почв центральной части Восточно-Европейской равнины (г. Москва и окрестности) и ее западной окраины (6 областей Республики Беларусь) [3, 4]. Среди проверенной части (42 штамма) московской коллекции было найдено 12 штаммов с крупными плазмидами (“московские” плазмиды). В коллекции из 55 штаммов *B. subtilis*, близких к *B. subtilis* 168, выделенных из лесных и луговых почв и других природных источников разных областей Республики Беларусь, было обнаружено 9 штаммов, несущих крупные плазмиды. “Белорусские” плазмиды были однородны по величине (около 100 тпн; [4]). Строение *rep*-областей одной из них, pBS72, отличалось от строения соответствующих областей уже известных крупных плазмид [5]. Затем обнаружилось, что *rep*-области остальных 8 крупных плазмид сходны с pBS72 [4]. Было сделано предположение, что такое сходство объясняется постоянным конъюгативным переносом этих плазмид, происходящим в природных условиях [4], тем более, что у одной из них, p19, были еще ранее обнаружены конъюгативные свойства [6]. Для провер-

ки этого предположения была изучена способность к конъюгации всех “белорусских” штаммов, содержащих крупные плазмиды, а также проведена проверка степени их сходства с “московскими” плазмидами, что составило цель настоящей работы. Для этого оценивались размеры плазмид, проверялась способность к гибридизации по Саузерну *rep*-области одной из “белорусских” плазмид с “московскими” и исследовались конъюгативные свойства “московских” плазмид.

Судя по полученным данным, все “белорусские” плазмиды обладают способностью к конъюгативной мобилизации мелкой плазмиды pUB110 и образуют по этому признаку, как и по другим критериям, весьма однородную группу. Почти все плазмиды из почв Москвы были неспособны к конъюгативной мобилизации, разнородны по размерам и не имели гомологии с “белорусской” группой плазмид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе представлены в таблице 1.

Плазмидную ДНК для последующей трансформации выделяли щелочным методом Бирнбойма и Доли [7]. Получение и трансформацию компетентных клеток *Bacillus subtilis* проводили по методу Анагностопулоса и Спицейзена [8] с небольшо-

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: prozorov@vigg.ru).

Таблица 1. Список использованных бактериальных штаммов и плазмид

Штаммы и плазмиды	Источник
<i>B. subtilis</i> BS1 (pBS1)*	Коллекция почвенных штаммов Белорусского государственного университета
<i>B. subtilis</i> BS15 (pBS15)*	»
» BS8 (pBS8)*	»
» BS57 (pBS57)*	»
» BSN1(pBSN1)	»
<i>B. subtilis</i> BS2 (pBS2)*	»
<i>B. subtilis</i> BS4 (pBS4)	»
» BS19 (p19)*	»
Те же штаммы с введенной в них плазмидой pUB110	Данная работа; кроме BS19 (p19 pUB110), который получен ранее [6]
<i>B. subtilis</i> 544 (p544)	Коллекция почвенных штаммов лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН
» 1337 (p1337)	»
» 1420 (p1420)	»
» 1440 (p1440)	»
» 1523 (p1523)*	»
» 1564 (p1564)*	»
» 1567 (p1567)*	»
» 1847 (p1847)*	»
» 1899 (p1899)	»
» 1420 (p1420 pUB110)	Данная работа
» 1440 (p1440 pUB110)	»
» 1899 (p1899 pUB110)	»
» BS19 (pUB110)	Музей штаммов лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН
» BS19–634 Str ^R	»
» 168 (pUB110) trpC2 thr5	»
» 168 trpC2 thr5	»
<i>E. coli</i> JM105 (pMTL19)	»

* Указанные штаммы помимо крупной плазмиды содержат одну мелкую криптическую плазмиду.

ми модификациями, принятыми на биологическом факультете Белорусского государственного университета. Получение регенерирующих протопластов и их трансформацию проводили, используя методику Чанг и Коэна [9]. Для конъюгативного переноса (мобилизации) плазмиды pUB110 в жидкой среде использовали методику, принятую в нашей лаборатории (Институт общей генетики РАН) [10]. Ночные культуры штаммов доноров (содержащих крупную плазмиду и мобилизуемую плазмиду pUB110) и реципиента, выращиваемые по отдельности в среде LB (“Fluka”) без антибиотиков при 30°C, разводили в 50 раз в свежей среде и выращивали при 37°C до концентрации 4–8 × 10⁸ клеток/мл. Далее смешивали по 0.1 мл культур донора и реципиента в 0.8 мл свежей среды и инкубировали при слабой аэрации в течении 3 ч. Затем конъюгационную смесь бактерий высевали на селективные среды – LB агар с добавлением антибиотиков. Добавляли канамицин (Km) в концентрации 15 мкг/мл и стрептомицин (Str) в концентрации 25 мкг/мл. Канамицин препятствовал росту клеток реципиента, стрептомицин – росту клеток донора. Вырастали лишь те клетки реципиента, которым при конъюгации передавалась мобилизуемая плазида pUB110, сообщавшая клеткам устойчивость к канамицину. В качестве контроля на те же среды высевали культуры донора и реципиента, росшие по отдельности. Титр клеток обоих партнеров определяли, высевая разведения конъюгационной смеси на LB-агар с каким-либо одним антибиотиком. Частота конъюгативного переноса определялась как отношение числа трансконъюгантов к числу клеток реципиента. Приводятся типичные данные одного из трех и более опытов.

Электрофорез плазмидной ДНК проводили в 1% агарозном геле (“Sigma”) в *tris*-боратном буфере. В качестве зонда при ДНК-ДНК гибридизации использовали *trp*-район p19, клонированный в плазмиде pMTL19 [5]. ДНК pMTL19 рестрицировали *EcoRI*, подвергали электрофорезу в агарозном геле, нужный фрагмент выделяли из геля, очищали от агарозы с помощью набора “Glass milk” (“Силекс”) и метили ³²P-дАТФ с помощью набора “Prime-a-Gene” (“Promega”). Перенос ДНК на нейлоновые фильтры (Hybond-N, “Amersham Biosciences”) и гибридизацию проб проводили по стандартным методам [11]. Гибридизацию и отмывку фильтров проводили при 65°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конъюгативные свойства исследованных крупных плазмид. Мы исследовали способность к конъюгативному переносу крупных плазмид у 8 штаммов *Bacillus subtilis* из белорусской коллекции и у 9 штаммов из московской коллекции (табл. 1). Конъюгативные плазмиды могут не только пере-

Таблица 2. Конъюгационный перенос плазмиды pUB110 из штаммов *B. subtilis* белорусской и московской коллекций, несущих крупные плазмиды

Штаммы-доноры	Штаммы-реципиенты	Количество конъюгантов в 1 мл конъюгационной смеси	Частота конъюгации (на клетку-реципиент)
Белорусская коллекция:			
BS1 (pBS1 pUB110)	BS19-634Str ^R	2.2×10^6	1.8×10^{-3}
BS15 (pBS15 pUB110)	BS19-634Str ^R	5.1×10^6	3.8×10^{-3}
BS8 (pBS8 pUB110)	BS19-634Str ^R	2.3×10^4	2.2×10^{-5}
BS57 (pBS57 pUB110)	BS19-634Str ^R	4.5×10^6	3.9×10^{-3}
BSN1 (pBSN1 pUB110)	BS19-634Str ^R	4.2×10^5	5.7×10^{-4}
BS2 (pBS2 pUB110)	BS19-634Str ^R	4.6×10^6	3.5×10^{-3}
BS4 (pBS4 pUB110)	BS19-634Str ^R	4.7×10^5	4.3×10^{-4}
BS19 (p19 pUB110)	BS19-634Str ^R	4.6×10^6	2.6×10^{-3}
“Московский” штамм 1387 (p1387-3 pUB110)*	RM125Cm ^R	2.7×10^3	10^{-7}

* Данные приведены по материалам статьи [12]; конъюгация с этим штаммом проводилась на фильтрах.

даваться сами, но и способствовать передаче (или мобилизации) других плазмид (обычно мелких). Поскольку крупные плазмиды, имевшиеся в нашем распоряжении, были криптическими, то мы могли судить об их конъюгативных свойствах лишь по способности мобилизовать мелкие плазмиды, несущие какой-либо селективный маркер. В качестве такой плазмиды была взята стафилококковая плазида pUB110, несущая ген устойчивости к канамицину (Km^R). Плазмиду pUB110 вводили в клетки штаммов с крупными плазмидами посредством трансформации компетентных клеток или трансформации регенерирующих протопластов. Оказалось, что все штаммы из белорусской коллекции были способны к трансформации компетентных клеток посредством ДНК pUB110. Частота трансформации изучаемых “белорусских” штаммов была различной. У штаммов BSN1 и BS4 частота достигала $1.1\text{--}1.78 \times 10^{-5}$ на клетку-реципиент, что сравнимо с частотой трансформации *B. subtilis* 168 (3.2×10^{-5} на клетку-реципиент). У штаммов BS1, BS15, BS57 и BS2 частота трансформации была ниже примерно в 10 раз ($1.2\text{--}3.3 \times 10^{-6}$ на клетку-реципиент). У штаммов BS8 и BS19 частота трансформации была очень низкой (1×10^{-7} на клетку-реципиент). Но в работе с московской коллекцией удалось ввести pUB110 в компетентные клетки лишь трех штаммов *B. subtilis* 1420, 1440, 1899. Частота трансформации этих штаммов была существенно ниже, чем у *B. subtilis* 168 и составляла у штамма 1420 – 1.5×10^{-6} ; у штамма 1440 – 1×10^{-7} и у штамма 1899 – 5×10^{-8} на клетку-

реципиент. Таким образом, в отличие от “белорусских” штаммов, большинство “московских” штаммов (*B. subtilis* 544, 1337, 1387, 1523, 1564, 1567 и 1847) не трансформировались плазмидной ДНК. Ранее плазида pUB110 была введена в регенерирующие протопласты штамма 1387 [12]. Остальным 6 штаммам с крупными плазмидами ни одним из способов pUB110 ввести не удалось, и в дальнейших опытах по мобилизации они не участвовали.

Следует отметить, что частота трансформации посредством плазмидной ДНК, и без того невысокая, зависела еще и от того, из какого штамма была выделена ДНК pUB110. Так у штаммов белорусской коллекции трансформанты возникали лишь в том случае, если плазмидную ДНК выделяли из производного “белорусского” же штамма BS19 (pUB110), лишённого крупной плазмиды. ДНК pUB110, выделенная из лабораторного штамма *B. subtilis* 168, в наших опытах “белорусские” штаммы не трансформировала. Напротив, все три “московских” штамма могли быть трансформированы лишь препаратом плазмидной ДНК из *B. subtilis* 168. Возможно, что такая разница зависела от различий в системах рестрикции-модификации.

Полученные плазмидные трансформанты проверялись методом электрофореза на наличие крупной плазмиды, присущей данному штамму, и плазмиды pUB110. Трансформанты, несущие обе плазмиды, использовались в дальнейших опытах по мобилизации pUB110 в качестве доноров.

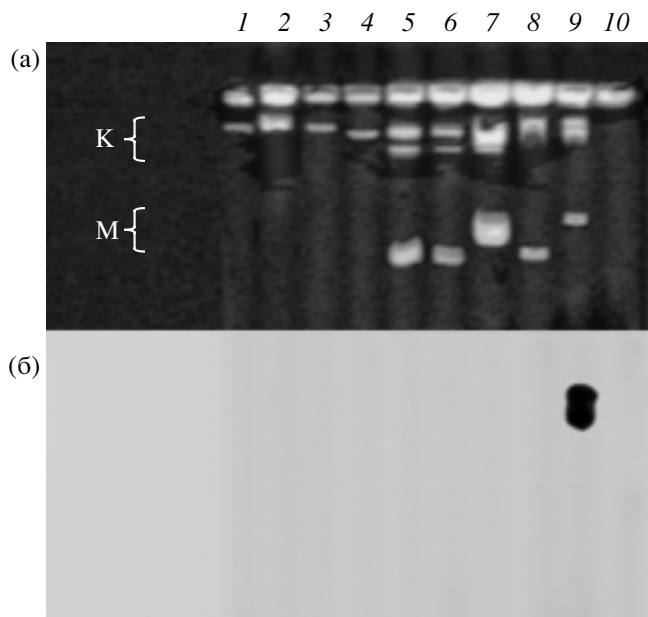


Рисунок. Электрофореграмма ДНК плазмид московской коллекции (а) и результаты их гибридизации с *rep*-областью “белорусской” плазмиды р19 (б). К – крупные плазмиды, М – мелкие плазмиды. Номера дорожек, соответствующих “московским” штаммам: 1 – 1899; 2 – 1337; 3 – 1420; 4 – 1440; 5 – 1523; 6 – 1564; 7 – 1567; 8 – 1847. Дорожка 9 – ДНК “белорусского” штамма BS19; 10 – ДНК лабораторного бесплазмидного штамма *B. subtilis* 168 trpC2 thr5. Крупные плазмиды р1523, р1564, р1567, р19 образовывали две подформы (дорожки 5, 6, 7, 9). В штаммах *B. subtilis* 1523, 1564, 1567, 1847 и BS19, кроме крупных, содержались также мелкие криптические плазмиды (дорожки 5, 6, 7, 8, 9).

Сводные данные по способности крупных плазмид к мобилизации содержатся в таблице 2 (приведены, в том числе, данные опытов с содержащейся в штамме 1387 плазмидой р1387-3 из нашей прежней работы [12]). Частота мобилизации в жидкой среде у пяти “белорусских” штаммов – BS1 (рBS1 рUB110); BS15 (рBS15 рUB110); BS57 (рBS57 рUB110); BS2 (рBS2 рUB110); BS19 (р19 рUB110) – достигала уровня 10^{-3} на клетку-реципиент; в прежних работах со штаммом BS19 (р19 рUB110) были получены сходные значения [10, 12]. У трех штаммов – BS8 (рBS8 рUB110); BSN1 (рBSN1 рUB110); BS4 (рBS4 рUB110) – частота мобилизации была ниже на 1–2 порядка. Правда, у штамма BS4 (рBS4 рUB110) наблюдаемое снижение абсолютного числа “мобилизантов” и частоты переноса рUB110, по-видимому, было связано с резким уменьшением числа клеток донора в конъюгационной смеси (такой эффект, связанный со взаимным бактериостатическим или бактерицидным действием, мы наблюдали и раньше, при скрещивании бацилл разных видов [13]). Другая картина наблюдалась с теми штаммами московской коллек-

ции, которым удалось ввести рUB110. К мобилизации была способна лишь плазида р1387-3, содержащаяся в штамме 1387. Частота мобилизации рUB110 у этого штамма была гораздо ниже, чем у штаммов белорусской коллекции, и составляла 10^{-7} на клетку-реципиент. У штамма 1387 мобилизация шла только на поверхности фильтров, но не в жидкой среде, и то лишь в том случае, если реципиентом был штамм *B. subtilis* RM125 Cm^R с нарушенной системой рестрикции-модификации [12]. У штаммов 1420, 1440 и 1899 мы не смогли обнаружить способности к конъюгативному переносу рUB110.

Способность к гибридизации плазмид московской коллекции с *rep*-областью “белорусских” плазмид и размеры “московских” плазмид.

Для дальнейшего сравнительного изучения плазмид обеих коллекций мы решили проверить, имеется ли гомология между *rep*-областью “белорусских” плазмид и “московскими” плазмидами. Выше упоминалось, что строение *rep*-области всех крупных плазмид, находящихся в штаммах, выделенных в Белоруссии, было сходным. Поэтому в качестве зонда для гибридизации по Саузерну было достаточно взять *rep*-область какой-либо одной такой плазмиды (в нашем случае р19).

Результаты гибридизации представлены на рисунке 1. Видно, что между *rep*-областью р19 и московскими плазмидами гибридизация отсутствовала. В то же время, фрагмент с *rep*-областью р19 давал четкую гибридизацию с препаратом ДНК самой плазмиды р19.

Еще одной характеристикой крупных плазмид могли служить их размеры. Величина плазмиды р19 из белорусской коллекции, судя по сумме размеров ее *Cla*I-фрагментов, была равна 96.7 тпн [6]. Величина всех остальных плазмид из той же коллекции, исходя из пробегов их ДНК на электрофореграмме, была такой же как и у р19 [4]. Среди крупных плазмид московской коллекции картина была другой. Плазида р1387-3 имела размер 35.5 тпн (по сумме *Eco*RI-фрагментов) [12], плазида р544 – 65 тпн (сумма *Kpn*I-фрагментов), р1899 – 60 тпн (сумма *Eco*RI-фрагментов) [неопубликованные данные]. Для других плазмид московской коллекции размеры плазмид по сумме рестриктных фрагментов не определяли, однако на электрофореграмме нативной ДНК крупных “московских” плазмид (рис. 1) видно, что плазмиды различаются по размеру. Три из них – р1523, р1564, р1567 – заметно легче, чем р19.

Таким образом, группа крупных плазмид, содержащихся в штаммах *B. subtilis* из почв Москвы, была достаточно гетерогенной.

ОБСУЖДЕНИЕ

Крупные плазмиды, находящиеся в штаммах *B. subtilis*, выделенных из разных районов Белоруссии (6 географических точек), судя по результатам этой и предыдущей [4] работ, оказались, во-первых, очень сходными, если не идентичными; во-вторых, они по ряду характеристик (величина, способность к перекрестной гибридизации, способность к мобилизации рUB110) отличались от плазмид московской коллекции. Возможно, что их единообразие объясняется, как и предполагалось ранее [4], постоянной миграцией между клетками бацилл в природных условиях, так как все они обладают, скорее всего, высокой частотой конъюгативного “самопереноса” (судя по их способности к мобилизации мелкой плазмиды рUB110). Ранее нами было показано, что рUB110 может быть мобилизована конъюгативной плазмидой р19 как в лаборатории в почвенных микрокосмах [14], так и в почвах некоторых подмосковных ландшафтов [15]. Конечно, можно допустить, что мигрируют и сами бациллы, содержащие плазмиды (например, за счет переноса спор ветром). Однако о возможной роли миграции именно плазмид посредством конъюгации или при помощи других видов горизонтального переноса, говорит и тот факт, что некоторые штаммы, содержащие очень похожие плазмиды, отличались друг от друга достаточно сильно (по антагонистическим свойствам и по частоте мобилизации рUB110). Строение мелких криптических плазмид в штаммах белорусской коллекции, по нашим данным, было также более однообразным, чем у мелких плазмид, содержащихся в штаммах из почв Москвы [16].

Напротив, трудно сказать, почему наблюдалось значительное разнообразие крупных плазмид в московской коллекции. Возможно, это объясняется их низкой конъюгативной активностью, или ее полным отсутствием, а следовательно, и отсутствием конъюгативного горизонтального переноса. К тому же, условия для горизонтального переноса в почве огромного индустриального города были, может быть, хуже, чем в различных природных ландшафтах Беларуси. Во всяком случае, вряд ли это связано с географическими различиями, так как климатические условия и рельеф местности на окраине Восточно-Европейской равнины (Беларусь) и ближе к ее центру (Москва) очень похожи.

Мы благодарим аспиранта И.П. Шиловского за техническую помощь в работе.

Работа финансировалась грантом РФФИ 04-04-81021 Бел 2004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoshimura K., Yamamoto O., Seci T., Oshima Y. Distribution of heterogenous and homogenous plasmids in *Bacillus* spp. // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 45. P. 1733–1740.
2. Незаметдинова В.З., Канапина А.Ш., Козловский Ю.Е., Прозоров А.А. Изучение плазмид, выделенных из почвенных штаммов бацилл // Генетика. 1992. Т. 28. № 3. С. 49–55.
3. Козловский Ю.Е., Прозоров А.А. Системы рестрикции-модификации у штаммов бацилл, близких к *Bacillus subtilis* // Докл. АН СССР. 1981. Т. 258. № 6. С. 1457–1459.
4. Лагодич А.В., Штанюк Я.В., Прозоров А.А., Туток М.А. Характеристика систем репликации плазмид природных штаммов *Bacillus subtilis* // Молекулярная биология. 2004. Т. 38. № 3. С. 437–441.
5. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich A.B., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Janniere L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector // Plasmid. 2003. Т. 49. P. 53–62.
6. Лотарева О.В., Незаметдинова В.З., Федорина Е.А., Полуэктова Е.У., Туток М.А., Прозоров А.А. Конъюгативная мобилизация, осуществляемая с высокой частотой природным штаммом *Bacillus subtilis*, несущим крупную плазмиду // Генетика. 2001. Т. 37. № 12. С. 1598–1603.
7. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acid Res. 1979. V. 7. P. 1513–1523.
8. Anagnostopoulus C., Spizizen J. Requirement for transformation in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1961. V. 81. P. 741–746.
9. Chang S., Cohen S. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA // Mol. Gen. Genet. 1979. V. 168. С. 111–115.
10. Poluektova E.U., Fedorina E.A., Lotareva O.V., Prozorov A.A. Plasmid transfer in Bacilli by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain // Plasmid. 2004. V. 52. P. 212–217.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Полуэктова Е.У., Незаметдинова В.З., Прозоров А.А. Крупная конъюгативная плаزمида из почвенного штамма *Bacillus subtilis* // Генетика. 2000. Т. 36. № 7. С. 1000–1002.
13. Лотарева О.А., Полуэктова Е.У., Федорина Е.А., Незаметдинова В.З., Прозоров А.А. Межвидовой и внутривидовой конъюгативный перенос различных плазмид у бацилл // Генетика. 2003. Т. 39. № 8. С. 1141–1144.
14. Лотарева О.В., Прозоров А.А. Конъюгативный перенос плазмид у *Bacillus subtilis* в условиях почвенных микрокосмов // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 780–784.
15. Лотарева О.В., Прозоров А.А. Конъюгативный перенос плазмиды рUB110 у *Bacillus subtilis* в почве различных природных ландшафтов // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С. 132–134.
16. Гагарина Е.Ю. Изучение мелких криптических плазмид, обнаруженных в почвенных штаммах *Bacillus subtilis* // Автореф. дисс. канд. биол. наук. Москва; Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. 2002.

СПОСОБНОСТЬ