

Клонирование генома *Rhizobium meliloti* в векторах различного типа

Т. Б. Румянцева, В. Н. Ерко¹, Б. В. Симаров

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии
189620, С.-Петербург, шоссе Подбельского, 3

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
252022, Киев, ул. Васильковская, 31/17

При использовании бактериофага *EMBL3* и плазмиды *pVZ361* в качестве векторов для клонирования гетерологичной ДНК получены представительные банки генов штаммов *CXM1* и *CXM1-188* *R. meliloti*. В процессе скрининга фагового банка генов идентифицированы бактериофаги, несущие фрагменты ДНК с симбиотическими генами (*nif*, *nod*) и генами *eff*⁺, предположительно участвующими в становлении эффективного бобово-ризобияльного симбиоза. Плазмидный банк генов использован для комплементации лейциновых ауксотрофов для изучения влияния ауксотрофности на развитие симбиоза между клубеньковыми бактериями люцерны и их растением-хозяином *Medicago sativa*.

Введение. Способность бактерий рода *Rhizobium* вступать в симбиоз с бобовыми растениями контролируется обширной группой генов [1], большая часть которых (*nod*, *nif*, *fix*) начинает функционировать только при взаимодействии с растением в процессе формирования симбиотического азотфиксирующего органа — клубенька — и репрессирована в свободноживущем состоянии [2]. В связи со сложностью идентификации этих генов, обусловленной синхронной экспрессией и репрессией растительных и бактериальных генов при образовании симбиоза, а также тем, что для анализа мутантов клубеньковых бактерий необходима постановка трудоемких вегетационных опытов с растениями, генетический анализ таких генов и выявление их роли в симбиозе сильно затруднены.

Ключевым этапом современного генетического анализа является получение банков генов изучаемого микроорганизма, в которых представлены полные наборы фрагментов геномной ДНК. Клонирование «симбиотических» генов с помощью банков генов позволяет в дальнейшем провести их структурно-функциональный анализ и определить характер экспрессии [3]. С другой стороны, они могут быть использованы для направленного конст-

руирования штаммов с улучшенными симбиотическими свойствами посредством создания генотипов, сочетающих разные аллели соответствующих симбиотических генов.

Применение векторов различного типа для конструирования банков генов зависит от цели исследования. Для клонирования генов, не имеющих четкого фенотипического проявления при росте в культуре («симбиотические» гены, гены синтеза фитогормонов, гены, мутации по которым приводят к утрате жизнеспособности, и др.), обычно используются фаговые банки генов. Плазмидные банки генов чаще применяются для клонирования генов с помощью комплементации функции их мутантного аллеля, если имеется возможность отличить исходный штамм от мутанта на селективных средах и в некоторых других случаях [4–6].

В данной работе проведено конструирование банков генов в векторах двух типов. Фаговый банк генов на основе бактериофага *EMBL3* был использован для клонирования участков ДНК, отвечающих за формирование симбиоза, а также участков, контролирующих эффективность симбиоза у штаммов *CXM1-188* и *CXM1-105* *R. meliloti*. Плазмидный вектор *pVZ361* был применен для построения банка генов штамма *CXM1* *R. meliloti* и клонирования локусов биосинтеза лейцина, ауксотрофность

по которым приводила к блокированию развития симбиоза.

Материалы и методы. *Бактериальные штаммы.* В работе использовали штаммы *Escherichia coli*: ВНВ2688 (*N205 recA* [*yimm*⁴³⁴, *cIts*, *b2*, *red*⁻, *Eam*, *Sam/γ*], γ -лизогенный штамм (для приготовления экстрактов для упаковки) [7]; ВНВ2690 (*N205 recA*⁻ [*yimm*⁴³⁴, *cIts*, *b2*, *red*⁻, *Dam*, *Sam/γ*], γ -лизогенный штамм (для приготовления экстрактов для упаковки) [7]; С600 (*F*⁻, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, λ) [7]; НВ101 (*hdsS*, *hdsM*, *pro*, *leu*, *thi*, *recA*, *Str*^r) [7]; ОТ14 (*Str*^r-мутант штамма LE392) [7]; Q359 (*hdsR*_k⁻, *hdsM*_k⁺, *supF*, ϕ 80, *P2*, *su*⁺ — хозяин для обнаружения *Spi*⁻-рекомбинантов бактериофага λ) [7]; QR48 (*recA*, *supE*), получен из ВНИИ Генетики, Москва; W3350 (*galKT*, *supO*, *Str*^s), получен из ВНИИ Генетики, Москва. Штаммы *R. meliloti*: СХМ1 (*Str*^r-мутант производственного штамма 425а, не отличающийся от него по симбиотической активности) [8]; СХМ1-188 (УФ-индуцированный мутант штамма СХМ1, превышающий его по азотфиксирующей активности и симбиотической эффективности) [9, 10]; Т46 (*Nod*, *leu*-мутант штамма СХМ1, несущий Тп5 в лейциновом локусе) [11]; Т511/6 и Т918/6 (*leu*, *met*-мутанты штамма СХМ1, полученные в результате переноса с помощью трансдукции *leu*::Тп5 фрагментов ДНК мутантов Т511 и Т918 в УФ-индуцированный метиониновый ауксотроф СХМ1-6 [9]. Коллекция лаборатории генетики и селекции микроорганизмов, ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (С.-Петербург) [12]; Т118 и Т482 (Тп5-мутанты штамма СХМ1-105 [9, 10] с повышенной симбиотической эффективностью) [13]; Т798 (Тп5-мутант штамма СХМ1-188 с повышенной симбиотической эффективностью) [13].

Плазмиды. *pVZ361* (*Nm*^r, *Km*^r, *IncQ*-группа несовместимости, дериват RSF1010, при клонировании по *Bam*III-сайту появляется устойчивость к стрептомицину) [14], *pKSK5* (*nodABC*-гены) [15]; *pID1* (*nifHDK*-гены *Klebsiella pneumoniae*) [16]; *pRK2013* (*Nm*^r, *ColE*-репликон, содержащий *tra*-гены плазмиды *pRK2*) [17].

Бактериофаги. EMBL3 (*red*^r, *gam*⁺, *chi*^r, *b189*, *N*, *nin5*) [18].

Питательные среды. Штаммы *R. meliloti* выращивали на среде RGMС (дрожжевой экстракт, 10 г/л; триптон, 10 г/л; NaCl, 8 г/л; глюкоза, 1 г/л; MgCl₂, 50 мМ; CaCl₂, 20 мМ); минимальная среда М9 [19] содержала в качестве источника азота 1 г/л (NH₄)₂SO₄, в качестве источника углерода — 4 г/л маннита. Штаммы *E. coli* выращивали на среде LB [7]. В твердые среды добавляли

16 г/л агара («Difco», США). Для культивирования бактериофагов использовали среду L (среда LB с добавлением 10 мМ MgSO₄) с агаром (12 г/л) или без него. Антибиотики использовали в следующих концентрациях: стрептомицин (Str) — 100 мг/л, ампициллин (Ap) — 20 мг/л, неомицин (Nm) — 20 мг/л и 100 мг/л для *E. coli* и *R. meliloti* соответственно.

Культивирование бактериофагов. 1 мл ночной культуры *E. coli* в среде L заражали фагом при множественности инфекции 0,01, инкубировали при 25 °С в течение 20 мин, после чего разбавляли в 500 раз средой L и выращивали в течение 16 ч с аэрацией при 37 °С. Для разрушения клеток добавляли хлороформ, очищали фаголизат от разрушенных клеток центрифугированием (3 мин, 14000 об/мин). Титр фага в надосадочной жидкости обычно находился в пределах 10¹⁰—10¹¹ частиц фага в 1 мл. Однородность препаратов фаголизатов проверяли на присутствие стандартных генетических маркеров (спектр адсорбции фага и иммунитет) по характеру роста на тестерных штаммах *E. coli*.

Выделение ДНК. Фаговую ДНК выделяли быстрым методом [20]. Препаративное выделение ДНК бактериофага EMBL3 проводили из 1 л культуры *E. coli* ОТ14 с последующей очисткой в ступенчатом градиенте плотности CsCl [7]. Полученные препараты фаговой ДНК проверяли на способность к упаковке *in vitro* и по характеру роста на тестерных штаммах *E. coli* (табл. I). Плазмидную ДНК выделяли с помощью метода щелочного лизиса из 20 мл ночной культуры *E. coli* [7]. Препаративное выделение плазмидной ДНК проводили из 500 мл ночной культуры *E. coli*, используя метод Бирнбойма—Доли [21] и очистку ультрацентрифугированием в градиенте плотности CsCl [7]. Тотальную ДНК *R. meliloti* выделяли с помощью модифицированного метода Мармура [22].

Получение рекомбинантной ДНК фага EMBL3. Рекомбинантные фаги EMBL3 получали лигированием частично рестрицированной тотальной ДНК штамма СХМ1 *R. meliloti* с рестрицированным препаратом ДНК фагового вектора в соотношении 1:3. Реакцию проводили при 12 °С в течение 2 ч, используя 85 ед. активности лигазы Т4 в 20 мкл смеси при конечной концентрации ДНК 400 мкг/мл.

Получение упаковочных экстрактов. Экстракты для упаковки рекомбинантной ДНК фага EMBL3 получали с использованием штаммов *E. coli* ВНВ2688 и ВНВ2690. Штаммы выращивали в 1,5 мл среды L при 32 °С до титра 2·10⁸, индуци-

Таблица 1

Способность к образованию негативных колоний фагами λ на газоне различных мутантов *E. coli* K12

Фаг	Фенотип фага	Генотип фага	Способность к образованию негативных колоний на газоне клеток штамма		
			OT14	QR48	Q359
EMBL3	<i>Spi</i> ⁺	<i>red</i> ⁺ <i>gam</i> ⁺ <i>chi</i> ⁻	+	+	-
EMBL3::CXM1-188	<i>Spi</i> ⁻	<i>red</i> ⁻ <i>gam</i> ⁻ <i>chi</i> ⁻	+	-	+

Примечание. «+» — образует; «-» — не образует негативных колоний.

рвали развитие фагов при 45 °С и инкубировали в течение 90 мин при 37 °С. Клетки бактерий осадили центрифугированием (10 мин, 8000 об/мин) и дальнейшую обработку биомассы каждого штамма осуществляли различными способами. Биомассу штамма ВНВ2690 ресуспендировали в 3,5 мл буфера А (20 мМ трис, рН 8,0; 3 мМ MgCl₂; 1 мМ ЭДТА; 0,05 %-й β-меркаптоэтанол) и обрабатывали ультразвуком 5—10 раз при максимальной амплитуде по 5 с с минутными интервалами. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали в течение 3 мин при 10 000 g и надосадочную жидкость хранили в жидком азоте до использования.

Биомассу штамма ВНВ2688 ресуспендировали в 6 мл раствора В (10 %-я сахароза; 0,05 М трис-НСl, рН 7,8), добавляли 150 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл в 0,01 М трис-НСl, рН 7,5) и разрушали замораживанием в жидком азоте и оттаиванием. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали в течение 5 мин (38 000 об/мин) в роторе Т175 при 2 °С, отбирали надосадочную жидкость, которую до использования хранили при -70 °С [23].

Упаковка фаговой ДНК. Для упаковки исходной и рекомбинантной ДНК фага EMBL3, а также ДНК фага λ к пробам ДНК (с концентрацией от 0,1 до 3,5 мкг в объеме 1—2 мкл) добавляли 10 мкл упаковочного экстракта штамма *E. coli* ВНВ2688, 7 мкл буфера А, 2 мкл буфера М1 (буфер М1 в 10 мл содержит 400 мкл смеси 50 мМ спермидина, 100 мМ путресцина, 9 мкл 1 М MgCl₂, 1 мкл β-меркаптоэтанол, 75 мкл 0,1 М АТФ и 9,515 мкл Н₂О) и 2—4 мкл упаковочного экстракта *E. coli* ВНВ2690. Упаковку проводили в течение 90 мин при 27 °С [23]. Эффективность упаковки проверяли по количеству негативных колоний на газоне штаммов *E. coli* OT14, ВВ101 и Y1088. Используя различные концентрации ДНК в пробе (от 0,1 до

3,5 мкг), определили, что максимальное число бляшкообразующих единиц (3·10⁸) возникает при упаковке 3 мкг ДНК фага. При дальнейшем увеличении концентрации ДНК эффективность упаковки не возрастала.

ДНК—ДНК гибридизация. Для скрининга фагового банка генов применяли гибридизацию негативных бляшек [24] с радиоактивно меченной плазмидой *pSUP2021*, несущей в своем составе Тn5. Фаги рассеивали на чашки Петри, не допуская сплошного лизиса бактерии-хозяина (не более 500 фаговых бляшек на чашку). С каждой чашки снимали по две идентичные реплики на нитроцеллюлозные фильтры. Фильтры последовательно обрабатывали денатурирующим (1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH) и нейтрализующим (1 М трис-НСl, рН 8,0, 1,5 М NaCl) растворами и дважды — 10×SSC, рН 7,0. После просушки фильтры прогревали при 80 °С в течение 2 ч в вакууме. Фильтры, дающие позитивный ответ на гибридизацию с зондом, сравнивали с исходными чашками Петри и вырезали агар с гибридизующимися бляшками. Далее фаги размножали и осуществляли повторную гибридизацию.

Блот-гибридизацию проводили по методу Саузерна [7, 25], дот-гибридизацию — по [23].

Для приготовления меченых зондов использовали препараты плазмидной ДНК, полученной после очистки центрифугированием в градиенте плотности CsCl для предотвращения появления неспецифических сигналов гибридизации. Зонды метили радиоактивными изотопами фосфора (³²P или ³³P) методом ник-трансляции [7].

Скрещивание бактерий. Штаммы-реципиенты Т46, Т511/6 и Т918/6 *R. meliloti* для скрещивания и комплементации их лейциновых ауксотрофностей выращивали в течение 16 ч на ротационном шейкере в жидкой среде RGMC при 180 об/мин и

28 °С. Штамм *E. coli* HB101, содержащий плазмиду-помощницу *pRK2013*, необходимую для мобилизации банка генов в реципиентный штамм, а также донорный штамм *E. coli* C600, содержащий банк генов *pVZ361::CXM1*, выращивали в жидкой среде LB, дополненной соответствующими антибиотиками, при 180 об/мин и 37 °С до середины логарифмической фазы роста. Осажденные центрифугированием клетки штамма-донора, помощника и штаммов-реципиентов ресуспендировали в дистиллированной стерильной воде. Скрещивание осуществляли на твердой среде RGMС (6 ч) при соотношении донор:помощник:реципиент 1:1:3. После скрещивания проводили скрининг *leu*⁺-трансконъюгатов: для штамма T46 *R. meliloti* — на твердой минимальной среде, для штаммов T511/6 и T918/6 *R. meliloti* — то же с добавкой метионина (20 мг/л).

Трансформация. Штамм *E. coli* C600 трансформировали рекомбинантной плазмидной ДНК в модификации Харди [26].

Анализ симбиотических свойств *R. meliloti*. Симбиотические свойства штаммов *R. meliloti* оценивали в микровегетационном опыте, согласно методике [27]. Смена люцерны с. Зайкевича стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 2 мин, промывали дистиллированной водой, проращивали в течение суток при 28 °С и высаживали в стерильные пробирки (20 × 200 мм), содержащие вермикулит и солевой питательный раствор. Проростки инокулировали суспензией бактерий 10⁷ клеток/растение. Выращивали растения в течение 5 недель при 22 °С, после чего определяли сухую массу побегов и присутствие в клубеньках бактерий соответствующего фенотипа.

Результаты и обсуждение. *Получение банка генов *R. meliloti* CXM1-188 в бактериофаге EMBL3.* Фаг EMBL3 имеет ряд генетических особенностей, способствующих клонированию в нем гетерологичной ДНК и селекции рекомбинантных фаговых частиц, в которые произошло встраивание чужеродной ДНК [4, 23]. Две полилинкерные последовательности с сайтами для эндонуклеаз рестрикции позволяют произвести замещение центральной части фага длиной 13,7 тыс. п. н., содержащей гены *red* и *gam*, гетерологичной ДНК. Присутствие генов *red* и *gam* в геноме EMBL3 определяет его фенотип как *Spi*⁺ и позволяет ему реплицироваться по механизму катящегося кольца и упаковываться в капсиды в штаммах *E. coli* OT14 и QR48. Ген *red* отвечает за общую фаговую рекомбинацию, а ген *gam* — за синтез ингибитора бактериальной *recBC*-экзонуклеазы. Их отсутствие приводит к блокированию σ -репликации. Развитие

фага EMBL3, несущего ген *gam*, в штамме *E. coli* Q359, лизогенном по фагу P2, невозможно из-за блокирования его репликации продуктом гена *old* фага P2. К росту на штамме Q359 способны только двойные мутанты *red*⁻, *gam*⁻ (*Spi*⁻-фенотип) за счет упаковки в капсид кольцевых конкатамерных молекул ДНК. Образование кольцевых конкатамеров происходит с помощью *recA*-пути рекомбинации, если у фага присутствует *chi*-сайт, узнаваемый *recBC*-эндонуклеазой, которая участвует в *recA*-зависимой рекомбинации. У вектора EMBL3 *chi*-сайт сохраняется при получении рекомбинантных *red*⁻ *gam*⁻-фагов. Жизнеспособность рекомбинантов *red*⁻ *gam*⁻ определяется системой рекомбинации хозяина. Штамм Q359 по системе рекомбинации относится к *recBC*⁻, и для рекомбинантных фагов путь репликации по механизму катящегося кольца не блокирован, в то время как исходный фаг EMBL3 не способен развиваться в данном штамме. Поэтому мы использовали штамм Q359 для селекции рекомбинантных фагов.

Стратегия получения банка генов заключалась в расщеплении ДНК фага EMBL3 и тотальной ДНК *R. meliloti* рестриктазой *EcoRI*, лигировании этих компонентов и селекции гибридной популяции фагов в штамме Q359 *E. coli*. Для определения общего числа жизнеспособных рекомбинантов лигированные смеси после упаковки *in vitro* высевали на газон бактерии *E. coli* OT14.

Для получения представительного банка генов потребовалось провести тестирование (проверку и определение рабочих концентраций) ключевых компонентов системы клонирования — экстрактов для упаковки фаговой ДНК в капсиды, препаратов тотальной ДНК *R. meliloti*, расщепленных ферментами до размеров, приемлемых для клонирования в векторе, и штаммов *E. coli*, используемых для селекции рекомбинантных фагов.

При конструировании банка генов штамма *R. meliloti* CXM1-188 его тотальную ДНК частично гидролизуют эндонуклеазой *EcoRI* до фрагментов 22—23 тыс. п. н., что является максимальной клонирующей емкостью для EMBL3 и позволяет в дальнейшем рекомбинантным фагам нормально упаковываться в капсиды и развиваться по литическому пути. Тотальную ДНК удалось частично расщепить при использовании 0,9 ед. активности *EcoRI* на 1 мкг ДНК с различным интервалом времени обработки одинаковых проб ферментом. Рестрицированную ДНК тестировали электрофорезом в 0,5 %-м агарозном геле. Проба тотальной ДНК оптимального размера получена при 30 мин-обработке ферментом. ДНК фага EMBL3 полностью расщепляли этой же рестриктазой.

При тестировании упаковочных экстрактов мы определили, что максимальное количество фаговой ДНК, которое упаковывается в капсиды *in vitro*, составляет 3 мкг в пробе (см. «Материалы и методы»). Поэтому при лигировании мы использовали по 3 мкг ДНК расщепленного вектора и варьировали количество гетерологичной тотальной ДНК *R. meliloti*. Лигированную рекомбинантную ДНК упаковывали *in vitro* с последующим заражением тестерного штамма *E. coli* Q359. После упаковки в донорные капсиды при соотношении вектор:встройка 3:1 получили $6 \cdot 10^4$ независимых фаговых клонов, которые были отобраны на тестерном штамме *E. coli* Q359. В качестве контроля на эффективность клонирования осуществляли контрольные упаковки фаговой ДНК, полученной на различных этапах конструирования банка. Эффективность формирования негативных клонов на тестерных штаммах *E. coli* упала у фага EMBL3, обработанного ферментами (рестриктазой и лигазой), по сравнению с эквивалентным количеством нативной ДНК на два порядка (10^6 и 10^8 соответственно). Это свидетельствует о том, что при лигировании рестрикция препятствовала образованию исходного фага EMBL3. При упаковке *in vitro* рекомбинантных фагов, представляющих банк генов (набор рекомбинантных EMBL3::CXM1-188), эффективность упаковки снизилась на четыре порядка (10^4) по сравнению с нативным фагом и на два порядка (10^6) по сравнению с фагом EMBL3, прошедшим через процессы рестрикции и лигирования (табл. 2).

Идентификация генов с помощью гомологичных зондов. Для идентификации в фаговом банке рекомбинантных фагов, несущих дикие копии генов, необходимых для дальнейших исследований, мы использовали радиоактивно меченные зонды. Зондом для поиска «симбиотических» генов (*nod*, *nif*) служил *EcoRI*-фрагмент (8,5 тыс. п. н.) с

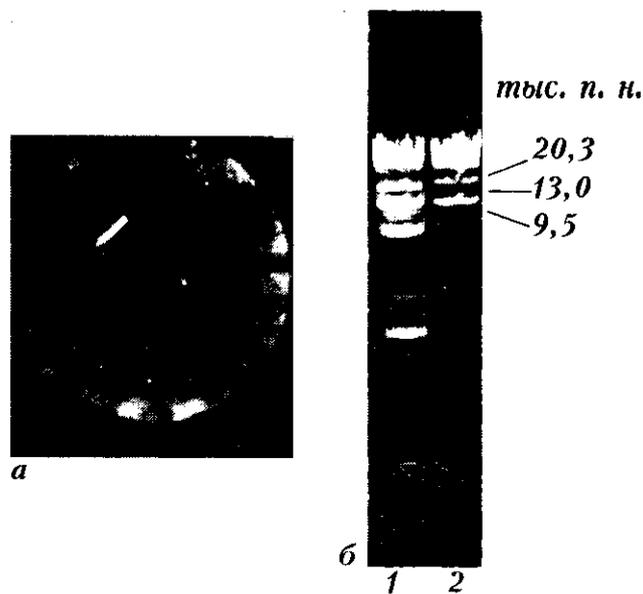


Рис. 1. Идентификация рекомбинантных фагов, несущих *nodABC*-гены *R. meliloti* CXM1-188: а — гибридизация негативных колоний, представляющих собой банк генов EMBL3::CXM1-188, с молекулярным зондом — *nodABC*-генами (стрелкой отмечена одна из негативных колоний, дающих позитивный ответ на гибридизацию); б — электрофоретграмма *EcoRI*-рестриктиков ДНК рекомбинантного фага EMBL3 с *nodABC*-генами (дорожка 1) и фага EMBL3 (дорожка 2)

nodABC-генами плазмиды *pKSK5* и *PstI*-фрагмент (4,8 тыс. п. н.) плазмиды *pID1* с *nifHDK*-генами. Результаты гибридизации *in situ* показали, что в построенном банке генов присутствуют рекомбинантные фаги, содержащие вышеперечисленные гены. На рис. 1 показана идентичность рекомбинантных фагов EMBL3 *nodABC*-генам. Из рис. 1, б,

Таблица 2
Получение банка генов штамма CXM1-188 *R. meliloti* в фаговом векторе EMBL3

ДНК вектора и вставки, мкг		Обработка ферментами	Количество бляшек лизиса, формируемых на газоне <i>E. coli</i>	
EMBL3	Тотальная ДНК CXM1-188		OT14	Q359
3	—	—	$3 \cdot 10^8$	0
3	—	<i>EcoRI</i>	$8 \cdot 10^2$	0
3	—	<i>EcoRI</i> , лигаза T4	$9 \cdot 10^6$	0
3	1	<i>EcoRI</i> , лигаза T4	$6 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$

видно, что отобранный после гибридизации *in situ* фаговый клон несет дополнительную ДНК.

Ранее в лаборатории генетики и селекции микроорганизмов ВНИИСХМ (С.-Петербург) была получена коллекция Тп5-мутантов *R. meliloti*, проявляющих повышенную эффективность (Eff^{++}) в симбиозе с *Medicago sativa*. Для идентификации фагов, несущих дикие копии фрагментов ДНК, мутации в которых приводили к повышенной эффективности симбиоза, были взяты в качестве зондов плазмиды *pSL6*, *pSL7* и *pSL9* (сконструированы Л. А. Шарыповой) с мутантными копиями eff^{++} -генов мутантов Т798, Т482 и Т118 *R. meliloti* соответственно. В результате гибридизации *in situ* банка генов с этими зондами отобраны рекомбинантные фаги ЕМВL3, названные нами FR482, FR118 и FR798, несущие дикие копии ДНК с eff^{++} -генами штаммов СХМ1-105 и СХМ1-188 *R. meliloti* соответственно. При блот-гибридизации *EcoRI*-фрагментов тотальной ДНК штаммов СХМ1-105, СХМ1-188 и мутанта Т482 *R. meliloti* с радиоактивно меченной ДНК рекомбинантного фага FR482 показано, что у мутанта Т482 исчезает *EcoRI*-фрагмент длиной около 4 тыс. п. н. и появляется фрагмент около 10 тыс. п. н., что свидетельствует о встраивании Тп5 в этот фрагмент при получении Eff^{++} -мутанта Т482 из исходного штамма СХМ1-105 (рис. 2).

Получение банка генов *R. meliloti* СХМ1 в плазмидном векторе. Банк генов штамма СХМ1 *R. meliloti* был построен в плазмидном векторе *pVZ361*, сконструированном и изученном группой



Рис. 2. Электрофорез (а) и блотинг-гибридизация (б) тотальной ДНК *R. meliloti*, рестрицированной *EcoRI*-эндоуклеазой, с ДНК рекомбинантного фага FR482, меченной изотопом ^{32}P : 1 — штамм СХМ1-188 *R. meliloti*; 2 — мутант Т482 *R. meliloti*; 3 — штамм СХМ1-105 *R. meliloti*; λE — ДНК фага λ, рестрицированная эндоуклеазой *EcoRI*

исследователей кафедры генетики МГУ. Особенностью этой плазмиды является наличие в ней гена устойчивости к стрептомицину, контролируемого репрессором, кодируемым двумя находящимися в составе плазмиды генами *tnpA* и *tnpR* фага λ. Ген *tnpR* содержит сайт для рестриктазы *BamHI*, встройка в который гетерологичной ДНК будет предотвращать выработку репрессора и соответственно позволит экспрессироваться гену стрептомицин-устойчивости. Эта особенность позволяет вести простой отбор рекомбинантов на среде, содержащей стрептомицин. Преимуществом этого вектора является его способность к мобилизации из *E. coli* в клетки клубеньковых бактерий при конъюгации с помощью конъюгативных плазмид (например *pRK2013*) благодаря наличию *mob*-сайта. Кроме того, плазмиды *pVZ361* способна реплицироваться в ризобиях, поскольку базовым репликоном для нее является плазмиды *RSF1010*, обладающая широким кругом хозяев среди грам-отрицательных бактерий.

Обычно емкость векторов типа *pVZ361*, имеющих размеры около 10 тыс. п. н., варьирует от 10 до 20 тыс. п. н. Для получения таких фрагментов нами была выделена тотальная ДНК из 5 мл жидкой культуры штамма СХМ1 *R. meliloti*, которую затем частично рестрицировали ферментом *BamHI* из расчета 10 ед. активности на 1 мкг ДНК. Качество рестрикции оценивали через определенные интервалы времени с помощью электрофореза в агарозном геле. Выход рестриктвов оптимального размера достигался при гидролизе в интервале от 15 до 20 мин. Для получения банка генов нами были использованы рестрикты после 15-мин гидролиза, размер которых варьировал от 15 до 20 тыс. п. н.

Центральным моментом для получения рекомбинантных плазмид, несущих в репликоне *pVZ361* фрагменты геномной ДНК штамма СХМ1 *R. meliloti*, была оптимизация условий системы трансформации штамма С600 *E. coli*. Для этого строили кривую поглощения плазмидной ДНК вектора компетентными клетками в зависимости от условий трансформации. Была определена оптимальная концентрация плазмидного вектора в условиях, дающих максимальный выход трансформантов. Она составила 100 нг плазмидной ДНК в 200 мкл суспензии компетентных клеток и обеспечивала максимальный выход неомицин-устойчивых клонов. Эти данные использовали при трансформации компетентных клеток рекомбинантными плазмидами *pVZ361::СХМ1* для получения наибольшего количества клонов *E. coli* С600 (*pVZ361::СХМ1*) в расчете на 1 мкг вектора.

Рекомбинантные ДНК *pVZ361::СХМ1* получа-

ли лигированием *Bam*HI-расщепленного вектора и частично рестрицированной тотальной ДНК *R. meliloti* CXM1 с применением 84 ед. активности лигазы T4. Осуществлено несколько вариантов лигирования, в которых использовали рестрикты размером 15 и 20 тыс. п. н. Полученными при этом лигазатами трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* С600. В результате получены $2 \cdot 10^3$ клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды *pVZ361::CXM1*. Частоты трансформации исходным вектором *pVZ361* и набором рекомбинантных векторов *pVZ361::CXM1* (прошедшим этапы рестрикции и лигирования с гетерологичной ДНК) составили 10^{-4} и 10^6 на 1 мкг вектора соответственно. Все полученные клоны, несущие *pVZ361::CXM1*, были *Str^r* и *Nm^r*, несущие исходный вектор *pVZ361* — *Str^s*, *Nm^r*.

Комплементация ауксотрофных мутаций банком генов *R. meliloti* CXM1. Полученный по вышеописанной методике банк генов штамма CXM1 *R. meliloti*, содержащийся в *E. coli* С600, использовали для комплементации ауксотрофных по лейцину мутаций у штаммов Т46, Т511/6 и Т918/6 *R. meliloti*, являющихся производными штамма CXM1 и содержащих Tn5 в двух различных лейциновых локусах на хромосоме [12].

В результате двух независимых трехродительских скрещиваний ауксотрофного по лейцину мутанта *R. meliloti* Т46, штамма *E. coli* HB101 (*pRK2013*) и банка генов *pVZ361::CXM1* получены 110 прототрофных клонов. Частота комплементации мутантного лейцинового гена составила 10^6

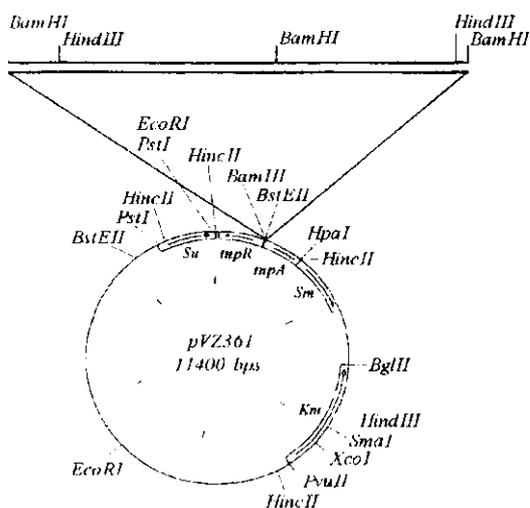


Рис. 3. Рекомбинантная плаزمида *pRVZ::Leu⁺* (23,8 тыс. п. н.)

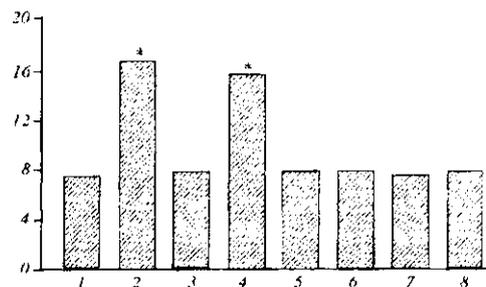


Рис. 4. Симбиотическая активность штаммов *R. meliloti*: 1 — контроль без инокуляции; 2 — *R. meliloti* CXM1 (*Fix⁺*); 3 — *R. meliloti* Т46 (*Nod⁻*); 4 — *leu⁺*-трансконъюгаты *R. meliloti* Т46, содержащие плазмиду *pVZ361::leu⁺* (*Fix⁺*); 5 — *R. meliloti* Т511/6 (*Nod⁻*); 6 — *leu⁺*-трансконъюгаты *R. meliloti* Т511/6 с плазмидой *pVZ361*, несущей в своем составе фрагмент ДНК, комплементирующий лейциновую ауксотрофность, но не способный к комплементации метиониновой ауксотрофности штамма Т511/6 (*Nod⁻*); 7 — *R. meliloti* Т918/6 (*Nod⁻*); 8 — *leu⁺*-трансконъюгаты *R. meliloti* Т918/6 с плазмидой *pVZ361*, несущей в своем составе фрагмент ДНК, комплементирующий лейциновую ауксотрофность, но не способный к комплементации метиониновой ауксотрофности штамма Т918/6 (*Nod⁻*). В скобках указан фенотип штамма. Опыт проводили в 12 повторностях. НСР₀₅ = 0,83; *варианты, существенно превышающие контрольный. По оси ординат — средняя масса сухих растений, мг

прототрофных клонов на реципиент при соотношении в смеси скрещивания донор:реципиент 1:10 и 10^8 — при соотношении 1:1. Из трансконъюгатов выделена рекомбинантная плазмиды, обозначенная *pRVZ::leu⁺*. С использованием эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Hind*III построена карта фрагмента ДНК, комплементирующего ауксотрофность по лейцину у мутанта Т46 (рис. 3).

Таким же образом была проведена комплементация лейциновых ауксотрофностей транспозантов Т511/6 и Т918/6, в результате которой получили по четыре прототрофных клона для каждого мутанта. При соотношении в смеси скрещивания донор:реципиент 1:3 частота образования прототрофных трансконъюгатов составила 10^7 .

Прототрофные трансконъюгаты, полученные от мутантов Т46, Т511/6 и Т918/6, были протестированы в микровегетационном опыте. Результаты изучения симбиотической активности мутантов и трансконъюгатов, содержащих соответствующие плазмиды, которые комплементируют лейциновую ауксотрофность, представлены на рис. 4. Видно, что масса растений, инокулированных прототрофными трансконъюгатами Т46 (*pVZ361::leu⁺*), соответствует массе растений штамма CXM1, что свидетельствует о нормальном клубенькообразовании и азотфиксации этих растений. Растения, инокули-

рованные трансконъюгатами T511/6 (*leu⁺, met⁻*) и T918/6 (*leu⁺, met⁻*), остаются на уровне контроля без инокуляции. На корнях этих растений образуются белые клубенкоподобные структуры, не способные к азотфиксации, что вызывает интерес, поскольку *Mef*-штамм CXM1-6, являющийся родительским штаммом, от которого произошла метиониновая ауксотрофность штаммов T511/6 и T918/6, имеет *Nod⁺, Fix⁻*-фенотип.

Из образовавшихся клубеньков были вновь выделены предполагаемые трансконъюгаты T46, среди которых только 46 % сохранили комплементирующую плазмиду *pRVZ::leu⁺*. В качестве контроля на стабильность плазмид в клетках, находящихся в клубеньках, в микроvegetационном опыте были использованы трансконъюгаты штамма CXM1, несущие космиду *pLAFR1*. Утрата космиды *pLAFR1*, не несущей гетерологичной ДНК в клубеньках, составила в наших экспериментах 3 % (табл. 3).

Цель данной работы состояла в 1) клонировании геномной ДНК *R. meliloti* в векторах двух типов: фаговом — EMBL3 и плазмидном — *pVZ361*; 2) идентификации в полученных банках генов рекомбинантов, несущих «симбиотические» гены (*nod, nif*) и гены, предположительно участвующие в становлении эффективного бобово-ризобияльного симбиоза.

Библиотека генов штамма CXM1-188 была сконструирована в бактериофаге EMBL3, а штамма CXM1 — в плазмидном векторе *pVZ361*. Эти векторы различаются по стратегии клонирования и так-

тике поиска нужных фрагментов ДНК в банке генов. Результаты клонирования в этих векторах геномной ДНК двух штаммов *R. meliloti* позволили дать сравнительную характеристику этих векторов при их применении для построения ризобияльных геномных библиотек (табл. 4).

Максимальная емкость клонирования у бактериофага EMBL3 и *pVZ361* теоретически отличается на 7 тыс. п. н. Существенно различно и количество полученных рекомбинантов — $6 \cdot 10^4$ для фага и на порядок меньше для плазмидного вектора — $2 \cdot 10^3$. Для определения количества гибридных фагов и плазмид, составляющих банк генов, использовали формулу [7]:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - x/y)}$$

где *N* — число клонов, с вероятностью *p* содержащее любую искомую последовательность ДНК; *p* — вероятность обнаружения искомой копии гена, равная 0,99; *x* — размер фрагмента ДНК, клонированного в векторе (для EMBL3 *x* = 24000 п. н.; для *pVZ361* — 17600 п. н.); *y* — размер генома (для *R. meliloti* *y* = $7 \cdot 10^6$, из которых $4 \cdot 10^6$ п. н. приходится на ДНК хромосомы и по $15 \cdot 10^5$ п. н. — на ДНК двух мегаплазмид — МЕГА 1 и МЕГА 2. Подставляя эти значения в формулу, получаем минимальное количество рекомбинантных векторов, необходимое для того, чтобы весь геном *R. meliloti* был представлен в полученной библиотеке генов. Таким образом, для фагового банка генов *N* = 1500,

Таблица 3

Утрата рекомбинантных плазмид *pVZ361::CXM1* и космиды *pLAFR1* у трансконъюгатов штамма CXM1 *R. meliloti*, выделенных из клубеньков люцерны

Плазмида, космида	Проверено клонов	Количество клонов с селективным маркером		Клоны, утратившие плазмиду, %
		Sm ^r , Nm ^r	Tc ^r	
<i>pVZ361::CXM1</i>	150	81	—	54
<i>pLAFR1</i>	100	—	97	3

Таблица 4

Клонирование генома *R. meliloti* в векторах различного типа

Тип вектора	Размер фрагмента ДНК, встраиваемого в вектор, тыс. п. н.	Количество полученных рекомбинантов	Количество рекомбинантов, представляющих геном <i>R. meliloti</i>
Бактериофаг EMBL3	24,0	60000	1500
Плазмида <i>pVZ361</i>	17,6	2000	1822

для плазмидного $N = 1822$. Из этого следует, что для идентификации индивидуальных генов в разных геномных библиотеках необходимо анализировать различное количество рекомбинантов. Сопоставив количество клонов в полученном банке генов с количеством клонов, требуемых для нахождения индивидуального гена (см. табл. 4, значения в колонках 3 и 4), можно утверждать, что нами получен представительный банк генов в фаге EMBL3 и пригодный для поиска генов методом комплементации банк в плазмиде *pVZ361*, что и было показано в процессе поиска *nodABC*-, *nifHDK*-, *eff*- и *leu*-генов *R. meliloti*.

Последние годы в исследованиях по симбиотической азотфиксации привели к осознанию необходимости проведения детального генетического анализа симбиотических свойств микросимбионта клубеньковых бактерий. Без выяснения генетического контроля наиболее существенных для симбиоза характеристик невозможен переход от стихийной аналитической селекции к направленному конструированию штаммов этих микроорганизмов с повышенной азотфиксирующей активностью и эффективностью. Поэтому клонирование генов, непосредственно не участвующих в симбиозе, но оказывающих значительное влияние на эффективность азотфиксации, усвоение фиксированного азота, а также на развитие симбиоза, для изучения их вклада в симбиотические взаимоотношения бактерий и растений является необходимостью в современных исследованиях биологической фиксации атмосферного азота.

Представителями таких генов являются *eff*⁺-гены *R. meliloti* [13], мутации в которых приводят к повышению эффективности усвоения фиксированного азота растением-хозяином. В результате построения банка генов *R. meliloti* в фаге EMBL3 проведено клонирование трех *eff*⁺-генов штаммов CXM1-105 и CXM1-188 *R. meliloti* с целью их дальнейшего изучения.

Другим представителем генов, не участвующих, по-видимому, непосредственно в симбиозе, но влияющих на его развитие, являются гены биосинтеза лейцина. Клонирование *leu*-генов штамма CXM1 *R. meliloti* было произведено с помощью банка генов, построенного на основе плазмиды *pVZ361*. Изучение роли этих генов в симбиозе является предметом дальнейшей работы.

Т. Б. Рум'янцева, В. Н. Єрко, Б. В. Сімаров

Клоування геному *Rhizobium meliloti* у векторах різного типу

Резюме

З використанням бактеріофага EMBL3 і плазмиди pVZ361 як векторів для клоування гетерологічної ДНК було отримано

банки генів штамів CXM1 та CXM1-188 *R. meliloti*. Під час скринінгу фагового банку «симбіотичними» генами (*nif*, *nod*) і *eff*⁺-генами, які, імовірно, беруть участь у розвитку бобово-ризобіального симбіозу. Плазмідний банк генів використано для комплементації лейцинових ауксотрофів для вивчення впливу ауксотрофності на розвиток симбіозу між бобовичковими бактеріями люцерни та їх рослиною-хазяїном *Medicago sativa*.

T. B. Rumiantseva, V. N. Yerko, B. V. Simarov

Cloning of genome of *Rhizobium meliloti* in vectors of different types

Summary

Using bacteriophage EMBL3 and plasmid pVZ361 as vectors for heterologous DNA cloning the gene banks of strains CXM1 and CXM1-188 *Rhizobium meliloti* have been obtained. When screening the phage bank of genes we identified bacteriophages containing DNA fragments with symbiotic genes (*nif*, *nod*) and *eff*⁺-genes which, obviously, take part in development of the legume-rhizobia symbiosis. The plasmid bank of genes has been used for complementation of leucine auxotrophs with the aim to investigate the impact of auxotrophy on development of symbiosis between nodule bacteria and their host-plant *Medicago sativa*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Long S. R. *Rhizobium* genetics // Annu. Rev. Genet.—1989.—23.—P. 483—506.
2. Watson R. J. Molecular genetics of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation // Biotechnol. Adv.—1989.—7.—P. 31—45.
3. Batut J., Terzaghi B., Gherardi M. et al. Localization of a symbiotic *fix* region on *Rhizobium meliloti* *pSym* megaplasmid more than 200 kilobases from the *nod-nif* region // Mol. and Gen. Genet.—1985.—199.—P. 232—239.
4. Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. Пер. с англ.—М.: Мир, 1988.—538 с.
5. Long S. R., Buikema W. J., Ausubel F. M. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of *Nod*⁻ mutants // Nature.—1982.—298.—P. 485—488.
6. Michiels J., Broek A. V., Vanderleyden J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Rhizobium phaseoli* *recA* gene // Mol. and Gen. Genet.—1991.—228.—P. 486—490.
7. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—545 p.
8. Федоров С. Н., Бутвина О. Ю., Сімаров Б. В. Мутагенное действие УФ-излучения на клубеньковые бактерии люцерны и анализ симбиотических свойств полученных ауксотрофных мутантов // Генетика.—1983.—19, № 5.—С. 727—736.
9. Федоров С. Н. Получение мутантов клубеньковых бактерий люцерны с измененными симбиотическими свойствами под действием УФ-излучения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Л., 1987.—16 с.
10. Федоров С. Н., Сімаров Б. В. Получение мутантов с измененными симбиотическими свойствами у *Rhizobium meliloti* под действием УФ-лучей // С.-х. биология.—1987.—9.—С. 44—49.
11. Aronshtam A. A., Umarov B. R., Yerko V. N. et al. Use of a *Rhizobium meliloti* cosmid gene bank for cloning the leucine biosynthesis gene, which is involved in regulation the development of nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa // Soviet Genetics.—29, N 2.—P. 185—192.
12. Єрко В. Н., Старченко Е. П. Комплементация

- лейциновой ауксотрофности *Rhizobium meliloti* банком генов *Rhizobium leguminosarum* // Физиология и биохимия культур растений.—1994.—26, № 3.—С. 264—268.
13. Ситаров Б. В., Шарыпова Л. А., Чеснокова О. Н. и др. Анализ Tn5-мутантов *Rhizobium meliloti* с повышенной симбиотической эффективностью // Генетика.—1990.—26, № 4.—С. 630—635.
 14. Zinchenko V. // Proc. 5 Int. Symp. on photosynthetic prokaryotes.—Grindewald, 1985.—P. 371.
 15. Kondorosi E., Banfalvi Z., Kondorosi A. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *R. meliloti*: identification of nodulation genes // Mol. and Gen. Genet.—1983.—36.—P. 445—452.
 16. Banfalvi Z., Sakanyan V., Koncz C. et al. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti* // Ibid.—1981.—184.—P. 318—325.
 17. Figurski D. H., Helinski D. R. Replication of an origin containing derivative of plasmid *RR2* dependent on a plasmid function provided in trans // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76.—P. 1648—1652.
 18. Frischanf A., Lehrach H., Poustka A., Murray N. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences // J. Mol. Biol.—1983.—170, N 4.—P. 827—842.
 19. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—507 с.
 20. Kaslov D. C. A rapid method for purifying λ DNA from phage lysates // Nucl. Acids Res.—1986.—14, N 16.—P. 6767.
 21. Birnboim H. C., Doly S. A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Ibid.—1979.—7.—P. 1513—1523.
 22. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol.—1961.—3.—P. 208—218.
 23. Мазин А. В., Кузнецов К. Д., Краев А. С. и др. Методы молекулярной генетики и геной инженерии.—Новосибирск: Наука, 1990.—248 с.
 24. Grunstein M., Hogness D. S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72.—P. 3961—3965.
 25. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.—1975.—98.—P. 503—517.
 26. Плазмиды. Методы / Под ред. К. Харди. Пер. с англ.—М.: Мир, 1989.—267 с.
 27. Федоров С. Н., Фокина И. Г., Ситаров Б. В. Оценка симбиотических свойств клубеньковых бактерий люцерны в лабораторных условиях // С.-х. биология.—1986.—1.—С. 112—118.

УДК 577.2:579.25:579.841.3
Поступила в редакцию 13.11.96