



ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Владимирова А.А.*, Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, г. Уфа, проспект Октября 71, лит. 1Е.

*E-mail: vladimirovaw@bk.ru

Резюме

Плазмиды представляют собой отдельные генетические элементы, которые способны к автономной репликации в бактериальной клетке. Данные структуры активно используются для генетической модификации различных микроорганизмов. Искусственное привнесение рекомбинантных плазмид оказывает дополнительную метаболическую нагрузку у бактерии реципиента, что может приводить к потере генно-инженерной конструкции. Модификация клубеньковых бактерий с целью получения высокоэффективных азотфиксирующих штаммов представляет большой интерес. Тем не менее, данных по стабильности наследования искусственных векторов среди рекомбинантных штаммов ризобий не так много. В данной работе была проведена оценка стабильного наследования вектора *pJN105ParaBAD* клубеньковыми бактериями трех основных родов: *Rhizobium*, *Sinorhizobium (Ensifer)* и *Mesorhizobium*. Показано, что устойчивость наследования рекомбинантных плазмид в исследуемых штаммах зависела от их таксономического положения. Медленнее всего потеря плазмид наблюдалась у бактерий рода *Ensifer*. Напротив, быстрая элиминация вектора была отмечена у бактерий рода *Mesorhizobium*.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, элиминация плазмид, антибиотик, вектор

Цитирование: Владимирова А.А., Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Исследования стабильности наследования рекомбинантных плазмид клубеньковыми бактериями // *Biomics*. 2021. Т.13(4). С.402-408. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-28

© Авторы

STUDY OF THE STABILITY OF RECOMBINANT PLASMIDS INHERITANCE BY NODULE BACTERIA

Vladimirova A.A.*, Akimova E.S., Koryakov I.S., Baymiev Al.Kh., Baymiev An.Kh.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, 450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71, lit. 1E

*E-mail: vladimirovaw@bk.ru

Resume

Plasmids are individual genetic elements that are capable of autonomous replication in a bacterial cell. These structures are actively used for genetic modification of various microorganisms. The artificial introduction of recombinant plasmids causes an additional metabolic load on the recipient bacterium, which can lead to the loss of the genetically engineered construct. Modification of nodule bacteria in order to obtain highly effective nitrogen-fixing strains is of great interest. However, there are not many data on the stability of the artificial vectors inheritance among recombinant rhizobia strains. In this work, we assessed the stable inheritance of the *pJN105ParaBAD* vector by nodule bacteria of three main genera: *Rhizobium*, *Sinorhizobium (Ensifer)*, and *Mesorhizobium*. It was shown that the stability of the recombinant plasmids inheritance in the studied strains depended on their taxonomic position. The slowest loss of plasmids was observed in bacteria of the genus *Ensifer*. On the contrary, quick elimination of the vector was observed in bacteria of the genus *Mesorhizobium*.

Keywords: nodule bacteria, elimination of plasmids, antibiotic, vector

Citation: Vladimirova A.A., Akimova E.S., Koryakov I.S., Baymiev Al.Kh., Baymiev An.Kh. Study of the stability of recombinant plasmids inheritance by nodule bacteria. *Biomcs.* 2021. V.13(4). P.402-408. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-28 (In Russian)

© **Authors**

Введение

Клубеньковые бактерии (ризобии) представляют собой группу симбиотических микроорганизмов, превращающих инертный азот атмосферы в усвояемую форму (аммиак) растением-хозяином в процессе, называемом биологической фиксацией азота. Такие бактерии способны ее осуществлять за счет наличия особых генов (*nif*-генов), кодирующих фермент нитрогеназу. Однако ризобии не способны фиксировать азот в свободноживущем состоянии, за исключением бактерий рода *Azorhizobium* [Dreyfus et al., 1983; Dreyfus et al., 1988; Terpololli et al., 2016]. Тем не менее, нами ранее была показана принципиальная возможность получения рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий, фиксирующих азот *ex planta*, за счет изменения регуляции *nif*-генов [Иванова и др. (Ivanova et al.), 2014; Баймиев и др. (Baymiev et al.), 2019; Владимирова и др. (Vladimirova et al.), 2021]. Для этого в бактерии были трансформированы плазмидные генно-инженерные конструкции, содержащими гены белков, участвующих в модификации регуляции синтеза нитрогеназы.

Искусственное привнесение в бактерии конструкций, несущих активно экспрессирующийся экзогенный ген, так или иначе, приводит к дополнительной нагрузке на бактериальную клетку. Известно, что микроорганизмы теряют природные плазмиды, в том числе это отмечается и у клубеньковых бактерий при субкультивировании [Weaver et al., 1990; Lopez-Guerrero et al., 2012]. Такая же ситуация возникает со штаммами микроорганизмов, трансформированные высококопийным вектором. Плазмиды с большим числом копий обычно теряются из бактериальной популяции с высокой скоростью, поскольку данные конструкции несут значительную метаболическую нагрузку и не имеют определенных факторов поддержания плазмиды, которые есть у природных плазмид и их стабильность в бактериальных клетках зависит от многих факторов, таких как генетический контроль репликации и сегрегации, мобилизация, несовместимость, скорость роста клеток, условия культивирования, воздействие экспрессии клонированного гена [Воробьев, Лапина (Vorob'ev, Larina), 1988; Million-Weaver, Camps, 2014].

Целью данной работы являлась оценка стабильности наследования привнесенных плазмид у рекомбинантных штаммов ризобий в зависимости от их родовой принадлежности.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны следующие ранее созданные рекомбинантные штаммы: 3 штамма *R. leguminosarum* рода *Rhizobium* (VSyl3, VSyl7, LPis4), 2 штамма рода *Ensifer* (*Ensifer* sp. MLu2, MLu10) и *Mesorhizobium* (*Mesorhizobium* sp. LZh1, LZh3), несущие дополнительную копию *nifA* гена своего рода. При этом исходные штаммы VSyl3 и VSyl7 были изолированы от горошка лесного (*Vicia sylvatica* L), а штамм LPis4 от чины гороховидной (*Lathyrus pisiformis*). Ген *nifA* был встроен в вектор *pJN105* с геном устойчивости к антибиотику – гентамицину [Владимирова и др. (Vladimirova et al.), 2021].

Исследование стабильности привнесенных плазмид в ризобии проводили путем последовательного размножения рекомбинантных штаммов в отсутствие давления отбора (антибиотика) [Peloquin et al., 2002; Ma et al., 2011]. Данные штаммы выращивали на жидкой среде Ym с добавлением гентамицина в концентрации 15 мкг/мл. Далее брали аликвоту из выращенной бактериальной культуры и переносили в жидкую среду без антибиотика. Бактерии наращивали до концентрации 1×10^8 КОЕ/мл без гентамицина и переносили ежедневно (штаммы рода *Rhizobium*, *Ensifer*) и через 4–5 дня (штаммы рода *Mesorhizobium*) при разведении 1:100 в свежую среду в течение 50 дней подряд. При переносе бактериальную суспензию объемом 10 мкл распределяли на агаризованную питательную среду с гентамицином по 3 чашки Петри на один образец. Затем чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 2 суток (штаммы рода *Rhizobium*, *Ensifer*) и 5 дней (штаммы рода *Mesorhizobium*) при 28°C. Опыт проводили в трех повторностях.

Для ПЦР-анализа аликвоту бактериальной культуры (1×10^8 КОЕ/мл) по 1 мл из каждого пассажа центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Образовавшийся осадок использовали для выделения ДНК. ПЦР осуществляли в приборе MC2 «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) со следующими праймерами: *pJN105seqF* 5'-gattattgacggcgctcacactt-3', *nifAvicR* 5'-tggegatcgcggtcactccttctcaca-3', *nifAsinoR* 5'-gctcgcgacgctttatc-3', *nifAmesoR* 5'-cgcgagccgggtcagag-3'. Схема режима амплификации: предварительная денатурация при 95°C (120 сек); 25 циклов: денатурация при 95°C (30 сек), отжиг при 54-56°C (40 сек), элонгация при 72°C (90 сек); финальная элонгация при 72°C (120 сек). Для ПЦР анализа было взято по 0,15 мкг ДНК (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific)

каждого образца. Потерю искусственно привнесенной плазмиды рекомбинантными штаммами ризобий оценивали по отсутствию роста на питательной среде с добавлением антибиотика и отсутствию или снижению маркерного фрагмента ДНК в образцах.

Результаты и их обсуждение

Часто стабильное наследование рекомбинантных плазмид наблюдается только под строгим селекционным давлением. Это может быть питательная среда с содержанием антибиотика, если имеется ген устойчивости к нему на привнесенной плазмиде или использование ауксотрофных штаммов бактерий при наличии на плазмиде гена/ов, который способен к компенсации недостающего питательного элемента. При отсутствии же селекции наследование плазмид будет зависеть от регуляции генетического наследования клетки хозяина, который может значительно отличаться в зависимости от его таксономического положения. Культивирование под селективным давлением, широко применяемое в биотехнологии имеет определенные ограничения. Например, оно не может быть применено при

использовании бактерий в качестве ростостимулирующих агентов в составе биоудобрений. И в этих условиях весьма актуальным становится информация о стабильности наследования рекомбинантных конструкций в тех или иных штаммах бактерий. Нами была проверена стабильность наследования плазмиды *pJN105ParaBAD* с различными вариантами гена *nifA* в штаммах клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Ensifer*.

Было обнаружено, что среди трансформированных ризобий наблюдается потеря вектора при долговременном культивировании данных микроорганизмов, причем отличия имеются даже среди штаммов одного вида бактерии (рис. 1). Так рекомбинантные штаммы *R. leguminosarum* VSyl3 и VSyl7, трансформированные конструкцией *pJN105ParaBADRhizo*, стабильно растут в течение 20 – 22 пассажей на среде с антибиотиком, что подтверждалось также ПЦП анализом (рис 1). У штамма LPis4 наблюдается постепенное снижение резистентности к гентамицину с 15-го пассажа и полная утрата роста на селективной среде происходит на 18 пассаже (рис. 1,2).

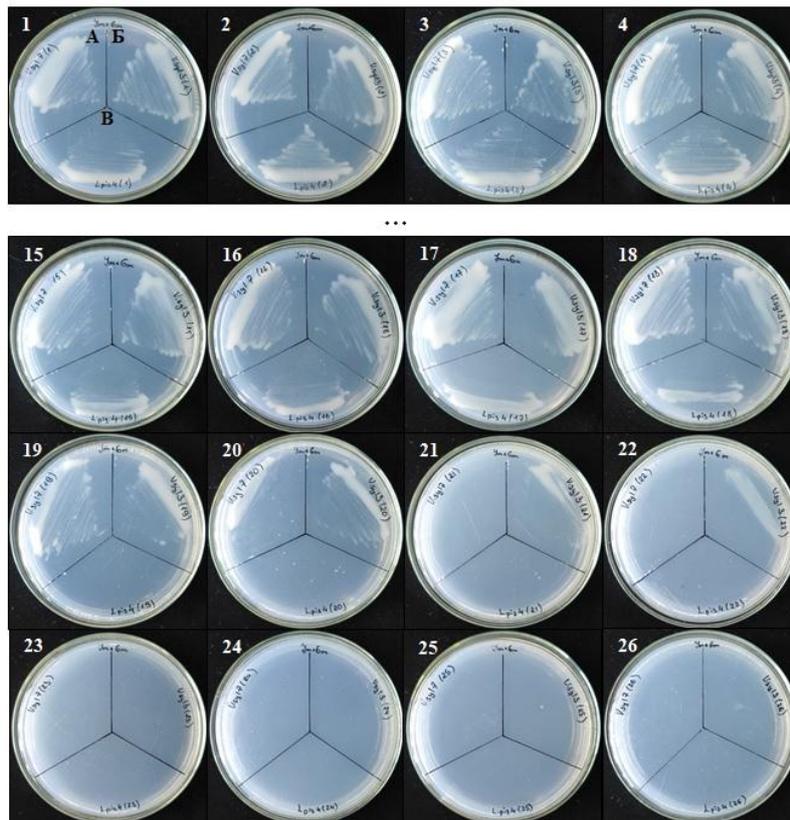


Рис. 1. Рост рекомбинантных штаммов на среде с антибиотиком в течение 26 пассажей. А – рекомбинантный штамм VSyl7ParaBADRhizo; Б – рекомбинантный штамм VSyl3ParaBADRhizo; Б – рекомбинантный штамм LPis4ParaBADRhizo

Fig. 1. Growth of recombinant strains on medium with antibiotic for 26 passages. А –recombinant strain VSyl7ParaBADRhizo; Б – recombinant strain VSyl3ParaBADRhizo; Б – recombinant strain LPis4ParaBADRhizo

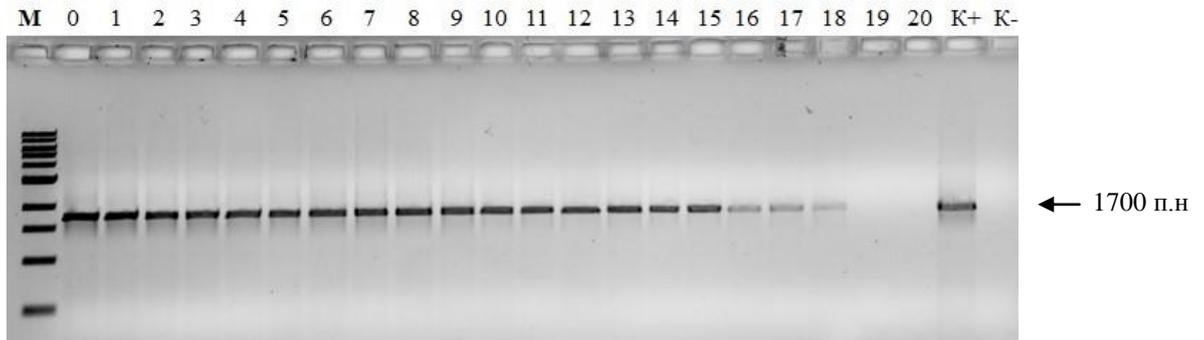


Рис. 2. Пример электрофореграммы анализа ПЦР продуктов рекомбинантного штамма *R. leguminosarum* LPis4ParaBADRhizo. М – маркер, 0–20 – количество пассажей

Fig. 2. Example of an electropherogram for the analysis of PCR products of the recombinant strain *R. leguminosarum* LPis4ParaBADRhizo. M – DNA ladder, 0–20 – number of passages

Совсем другие результаты выявляются при рассмотрении рекомбинантных штаммов, относящихся к другим родам клубеньковых бактерий. Так, рекомбинантный штамм MLu2ParaBADsino, относящийся к роду *Ensifer*, стабильно рос на среде с селективным маркером в течение 40 пассажей (рис. 3). Аналогичные данные были получены с другим штаммом рода *Ensifer* MLu10ParaBADsino, что может

послужить подтверждением значения таксономической принадлежности.

Быстрее же всего плазмиды терялись у рекомбинантных клеток, относящихся к роду *Mesorhizobium*. Так штаммы *Mesorhizobium* sp. LZh1ParaBADMeso и LZh3ParaBADMeso показали снижение роста на среде с антибиотиком уже с 4-го пассажа (рис. 4).

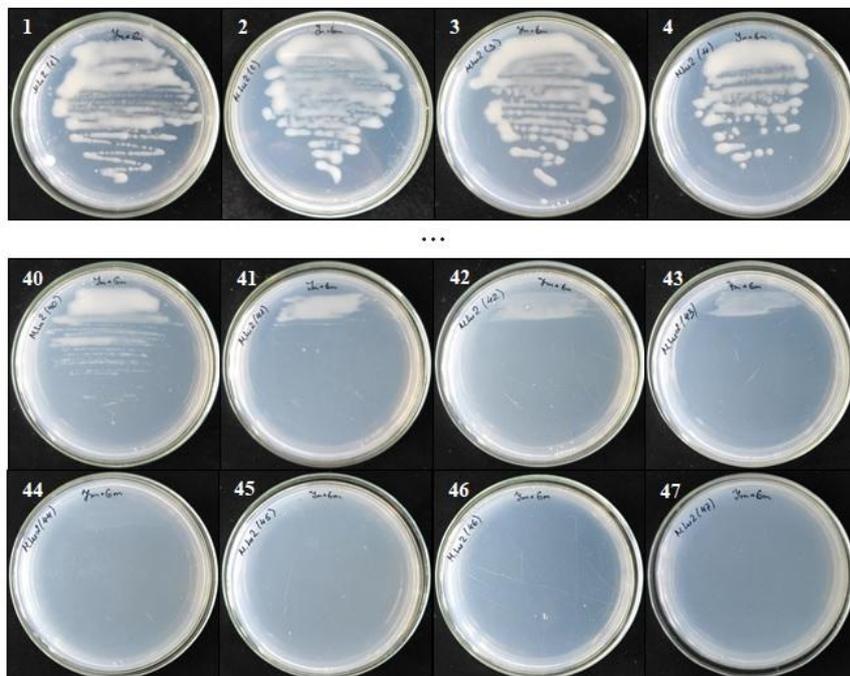


Рис. 3. Рост рекомбинантного штамма MLu2ParaBADsino на среде с антибиотиком в течение 47 пассажей

Fig. 3. Growth of the recombinant strain MLu2ParaBADsino on a medium with an antibiotic for 47 passages



Рис. 4. Рост рекомбинантного штамма LZh1ParaBADMeso на среде с антибиотиком в течение 8 пассажей
 Fig. 4. Growth of recombinant strain LZh1ParaBADMeso on medium with antibiotic for 8 passages

Таким образом, генно-инженерные конструкции, полученные на основе плазмиды широкого круга с репликоном BBR1 у рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий имеют разную стабильность наследования. При этом явно прослеживается значение таксономического положения этих штаммов. Медленнее всего потеря плазмид происходит у бактерий рода *Ensifer* (*Sinorhizobium*), где у клеток не прослеживается явной потери плазмиды вплоть до 40-го пассажа. У штаммов рода *Rhizobium* плазмиды сохраняются немного меньше и стабильный рост рекомбинантные бактерии на селективной среде показывают в течение 20 пассажей. Наиболее быстрая элиминация плазмиды происходит у бактерий рода *Mesorhizobium*, где они более или менее сохраняются только в течение первых 4 пассажей. Полученные нами данные отражают разное отношение к стабильному наследованию привнесенных в клетку плазмид. Так, например, у быстрорастущих ризобий, к которым относятся бактерии рода *Rhizobium* и *Ensifer* у природных штаммов в клетках часто обнаруживаются большое количество разных плазмид, которые как часть генома имеют важное значение в определении общего фенотипа данных микроорганизмов. Необходимо отметить, что симбиотические гены, которые делают возможным отнесение данных микроорганизмов к группе клубеньковых бактерий, тоже имеют плазмидную локализацию. Напротив, у бактерий рода *Mesorhizobium* обнаружение в клетках плазмид редкое событие, симбиотические гены у данных микроорганизмов находятся на хромосоме в составе мобильных конъюгативных элементов, так называемых ICESym [Colombi et al., 2021]. Разное отношение бактерий к наследованию внехромосомной части генома непременно отражается на стабильности рекомбинантных вариантов штаммов, что обязательно должно учитываться при постановке экспериментов с

применением микроорганизмов с привнесенными генно-инженерными конструкциями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-24-00207.

Литература

1. Баймиев Ан .X, Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у клубеньковых бактерий *ex planta* // Экологическая генетика. 2019. Т. 17(2). С. 35–42. doi: 10.17816/ecogen17235-42
2. Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Функциональная специфичность продукта гена *nifA* в пределах группы клубеньковых бактерий // Микробиология. 2021. Т. 90(4). С. 471–479. doi: 10.31857/S0026365621040194
3. Воробьев А.А., Лапина Г.Ф. Стабильность плазмидных векторов в рекомбинантных микроорганизмах // Биотехнология. 1988. Т. 4(4). С. 433–441.
4. Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Баймиев Ан.Х. Искусственная регуляция генов, кодирующих белки нитрогеназного комплекса ризобияльных бактерий // Вестник Оренбургского государственного университета. 2014. Т. 174(13). С. 36–39.
5. Colombi E., Perry B.J., Sullivan J.T., Bekuma A.A., Terpolilli J.J., Ronson C.W., Ramsay J.P. Comparative analysis of integrative and conjugative mobile genetic elements in the genus *Mesorhizobium* // Microbial Genomics. 2021. V. 7(10). P. 000657. doi: 10.1099/mgen.0.000657
6. Dreyfus B., Garcia J.L., Gillis M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-

- fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata* // International Journal of Systematic Bacteriology. 1988. V. 38(1). P. 89–98. doi:10.1099/00207713-38-1-89
7. Dreyfus B.L., Elmerich C., Dommergues Y. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source // Applied and Environmental Microbiology. 1983. V. 45(2). P. 711–713. doi:10.1128/AEM.45.2.711-713.1983
 8. López-Guerrero M.G., Ormeño-Orrillo E., Acosta J.L., Mendoza-Vargas A., Rogel M.A., Ramírez M.A., Rosenblueth M., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E. Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches // Plasmid. 2012. V. 68(3). P. 149–158. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.002
 9. Ma L., Zhang G., Doyle M.P. Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 for safety-related studies // PloS one. 2011. V. 6(4). P. e18083. doi: 10.1371/journal.pone.0018083
 10. Million-Weaver S., Camps M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? // Plasmid. 2014. V. 75. P. 27–36. doi: 10.1016/j.plasmid.2014.07.002
 11. Peloquin J.J., Kuzina L., Lauzon C.R., Miller T.A. Transformation of internal extracellular bacteria isolated from *Rhagoletis completa* Cresson gut with enhanced green fluorescent protein // Current microbiology. 2000. V. 40(6). P. 367–371. doi: 10.1007/s002840010072
 12. Terpolilli J.J., Masakapalli S.K., Karunakaran R., Webb I.U., Green R., Watmough N.J., Kruge, N.J., Ratcliffe R.G., Poole P.S. Lipogenesis and redox balance in nitrogen-fixing pea bacteroids // Journal of Bacteriology. 2016. V. 198. P. 2864–2875. doi:10.1128/JB.00451-16
 13. Weaver R.W., Wei G.R., Berryhill D.L. Stability of plasmids in *Rhizobium phaseoli* during culture // Soil Biology and Biochemistry. 1990. V. 22(4). P. 465–469. doi:10.1016/0038-0717(90)90179-4
- References**
1. Baymiev An.K., Gumenko R.S., Vladimirova A.A., Akimova E.S., Vershinina Z.R., Baymiev Al.K. Artificial activation of *nif*-gene expression in nodule bacteria *ex planta*. Ecological genetics. 2019. V. 17(2). P. 35–42. doi: 10.17816/ecogen17235-42
 2. Colombi E., Perry B.J., Sullivan J.T., Bekuma A.A., Terpolilli J.J., Ronson C.W., Ramsay J.P. Comparative analysis of integrative and conjugative mobile genetic elements in the genus *Mesorhizobium*. Microbial Genomics. 2021. V. 7(10). P. 000657. doi: 10.1099/mgen.0.000657
 3. Dreyfus B., Garcia J.L., Gillis M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. International Journal of Systematic Bacteriology. 1988. V. 38(1). P. 89–98. doi:10.1099/00207713-38-1-89
 4. Dreyfus B.L., Elmerich C., Dommergues Y. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. Applied and Environmental Microbiology. 1983. V. 45(2). P. 711–713. doi:10.1128/AEM.45.2.711-713.1983
 5. Ivanova E.S., Gumenko R.S., Baymiev An.K. Iskusstvennaja reguljacija genov, kodirujushih belki nitrogenaznogo kompleksa rizobial'nyh bakterij. Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2014. V. 174(13). P. 36–39. [Artificial regulation of nitrogen fixation genes of rhizobium species] (In Russian)
 6. López-Guerrero M.G., Ormeño-Orrillo E., Acosta J.L., Mendoza-Vargas A., Rogel M.A., Ramírez M.A., Rosenblueth M., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E. Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. Plasmid. 2012. V. 68(3). P. 149–158. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.002
 7. Ma L., Zhang G., Doyle M.P. Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 for safety-related studies. PloS one. 2011. V. 6(4). P. e18083. doi: 10.1371/journal.pone.0018083
 8. Million-Weaver S., Camps M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? Plasmid. 2014. V. 75. P. 27–36. doi: 10.1016/j.plasmid.2014.07.002
 9. Peloquin J.J., Kuzina L., Lauzon C.R., Miller T.A. Transformation of internal extracellular bacteria isolated from *Rhagoletis completa* Cresson gut with enhanced green fluorescent protein. Current microbiology. 2000. V. 40(6). P. 367–371. doi: 10.1007/s002840010072
 10. Terpolilli J.J., Masakapalli S.K., Karunakaran R., Webb I.U., Green R., Watmough N.J., Kruge, N.J., Ratcliffe R.G., Poole P.S. Lipogenesis and redox balance in nitrogen-fixing pea bacteroids. Journal of Bacteriology. 2016. V. 198. P. 2864–2875. doi:10.1128/JB.00451-16
 11. Vladimirova A.A., Gumenko R.S., Akimova E.S., Baymiev Al.K., Baymiev An.K. Functional specificity of the *nifA* gene product within the group of root nodule bacteria. Microbiology.

2021. V. 90(4). P. 481–488. doi: 10.31857/S0026365621040194
12. Vorob'ev A.A., Lapina G.F. Stabil'nost' plazmidnyh vektorov v rekombinantnyh mikroorganizmah. *Biotehnologija*. 1988. T. 4(4). С.433–441. [Stability of plasmid vectors in recombinant microorganisms] (In Russian)
13. Weaver R.W., Wei G.R., Berryhill D.L. Stability of plasmids in *Rhizobium phaseoli* during culture. *Soil Biology and Biochemistry*. 1990. V. 22(4). P. 465–469. doi:10.1016/0038-0717(90)90179-4