

Выделение, определение нуклеотидной последовательности и сравнительный анализ плазмид бактерий *Bacillus pumilus*

О. В. Евдокимова^{1*}, Л. Н. Валентович^{1,2}

¹Институт микробиологии НАН Беларуси
Беларусь, 220141 г. Минск, улица Купревича, 2.

²Белорусский государственный университет
Беларусь, 220030 г. Минск, проспект Независимости, 4.

*Email: evdokimovalesia@gmail.com

В ходе исследования были выделены плазмиды природных бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси. По размеру и рестрикционному профилю внехромосомные генетические элементы были распределены в 7 подгрупп. Определены полные нуклеотидные последовательности представителей каждой из семи подгрупп, установлена принадлежность данных плазмид к семейству pC194 (RCR тип). В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей и предсказанных аминокислотных последовательностей были выявлены консервативные локусы, характерные для большинства плазмид данного семейства, в двух плаزمиде были определены уникальные модули (мигрирующий элемент pBP-T2 и ParABC pBP-6322).

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, внехромосомные генетические элементы, плазмиды.

Присутствие в клетке внехромосомных генетических элементов достаточно распространенное явление в царстве Бактерий. Плазмиды наряду с бактериофагами и транспозонами, рассматриваются как основные инструменты эволюции прокариот, поскольку эти элементы несут пул генов, циркулирующих не только в пределах одной бактериальной популяции, но и доступных клеткам различных таксономических групп. Плазмиды грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* были выявлены Lovett P. S. с соавторами еще в середине 70-х годов прошлого века. Было установлено, что представители данной таксономической группы, как и близкородственные *B. subtilis*, могут обладать двумя типами плазмид: крупными мегаплазмидами (более 40 тыс. н.п.) и плазмидами небольшого размера (до 10 тыс. н.п.) [1]. Позже было выяснено, что крупные плазмиды по механизму репликации относятся к тета-типу, репликация мелких плазмид осуществляется в соответствии с механизмом «катящегося кольца» (RCR, rolling circle replication) [2]. Несмотря на сходство с плазмидами *B. subtilis*, считается, что частота встречаемости внехромосомных генетических элементов у *B. pumilus* невысокая [3]. На данный момент в публикациях и общедоступных базах данных нуклеотидных последовательностей присутствует информация только о 19 плазмидах

B. pumilus, причем большинство было выделено из штаммов, представляющих коммерческий интерес. В настоящее время плазмиды остаются в фокусе научного интереса, поскольку представляют собой основу для создания инструментов молекулярно-генетических исследований и генно-инженерных манипуляций.

Целью данной работы являлось выявление, определение нуклеотидной последовательности и сравнительный анализ плазмид штаммов *B. pumilus*, изолированных на территории Беларуси.

В результате скрининга более 40 штаммов бактерий *B. pumilus*, выделенных в различных регионах Беларуси, было выявлено, что 19 исследованных штаммов содержат плазмиды размером от 6200 до 8500 н.п. [4]. Плазмидные ДНК данных штаммов выделяли методом щелочного лизиса и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HindIII и EcoRI. На основании сходства размера и рестрикционного профиля, изучаемые 19 плазмид были распределены в семь подгрупп. Для семи плазмидных ДНК (по одной из каждой подгруппы) была определена полная нуклеотидная последовательность. Полученные нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности открытых рамок считывания (ОРС) сравнили с записями из базы данных ГенБанк с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Как показано в таблице 1, нуклеотидные последовательности плазмид *B. pumilus* имеют различную степень сходства с плазмидами RCR-типа бактерий *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. safensis*. Так рВР-33.4 практически идентична плазмиде рВр15.1S, выделенной из бактерий энтомопатогенного штамма *B. pumilus* 15.1 [3] и данный тип плазмид наиболее распространен в исследуемой выборке (11 из 19), а рВР-6322 в большей степени сходна с последовательностью рРОD2000 (*B. subtilis*), известной также под названием рТА1050 [5]. При сравнении нуклеотидных последовательностей установлена локализация сайтов *dso* (сайт инициации репликации ведущей нити ДНК), *sso* (сайт инициации репликации запаздывающей нити ДНК) и консервативных участков *rep*-гена, идентичных с таковыми типовых плазмид *Bacillus* семейства рС194, что свидетельствует о принадлежности изучаемых плазмид *B. pumilus* к данному семейству (рис. 1).

Помимо репликационного модуля во всех анализируемых последовательностях обнаружены открытые рамки считывания, аминокислотные последовательности которых имели высокую степень сходства с известными белками из базы данных NCBI. В частности, все плазмиды содержали ОРС, имеющие высокую степень идентичности с хромосомными генами *rapA* (регулятор аспартилфосфатаза), идентифицированными также во многих плазмидах RCR-типа семейства рС194 представителей *Bacillus*. Большинство Rap-аспартилфосфатаз организованы в один оперон с *prh*, кодирующим Phr-пептид, специфически ингибирующий активность соответствующей фосфатазы и выполняющий роль сигнальной молекулы [6]. Небольшие ОРС (около 40 кодонов), пред-

Таблица 1. Результаты сравнения последовательности плазмидной ДНК *B. pumilus* с нуклеотидными последовательностями из базы данных ГенБанк

Плазмида, размер, н.п.	Сходные последовательности в ГенБанке*	Степень покрытия	Идентичность	Код доступа в ГенБанке
pBP-33.4, 7753	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	100%	99%	KM348008.1
	pTA1040, <i>B. subtilis</i>	38%	89%	U32378.1
	pGR8, <i>B. pumilus</i>	49%	95%	CP009109.1
pBP-B171, 7210	pGR8, <i>B. pumilus</i>	83%	98%	CP009109.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	83%	79%	CP016785.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	58%	96%	KM348008.1
pBP-6322, 8597	pPOD2000, <i>B. subtilis</i>	79%	98%	U55043.1
	pBA64, <i>B. safensis</i>	42%	95%	JX134061.1
	pSH1452, <i>B. pumilus</i>	34%	88%	U53767.1
pBP-33-3, 6432	pGR8, <i>B. pumilus</i>	74%	97%	CP009109.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	72%	94%	CP016785.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	64%	96%	KM348008.1
pBP-MRL1, 6244	pPL10, <i>B. pumilus</i>	69%	95%	AF036712.1
	pPL7065	36%	95%	AY230134.1
	pPOD2000, <i>B. subtilis</i>	51%	95%	U55043.1
pBP-B394, 6580	pC2-2, <i>B. pumilus</i>	61%	94%	MF503687.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	61%	94%	CP016785.1
	pTA1040, <i>B. subtilis</i>	70%	94%	U32378.1
pBP-T2, 8008	pGR8, <i>B. pumilus</i>	59%	97%	CP009109.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	51%	96%	KM348008.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	58%	94%	CP016785.1

*В таблице представлены первые три записи сходных последовательностей в ГенБанке для каждой плазмиды.

шестьющие 3'-концу *rapA* гена, предсказанная аминокислотная последовательность которых сходна с последовательностью P_{hr}, также присутствуют в анализируемых плаزمидях. Таким образом, можно предположить наличие функционирующей Rap-P_{hr}-системы, имеющей плазмидную локализацию у бактерий *B. pumilus* и выполняющей регуляторную функцию.

Плазмида pBP-T2 содержит рамку считывания из 450 аминокислотных остатков на 99% идентичную последовательности белка транспозазы семейства IS5/IS1182. Ген транспозазы фланкирован короткими инвертированными повторами (IS). Подобные

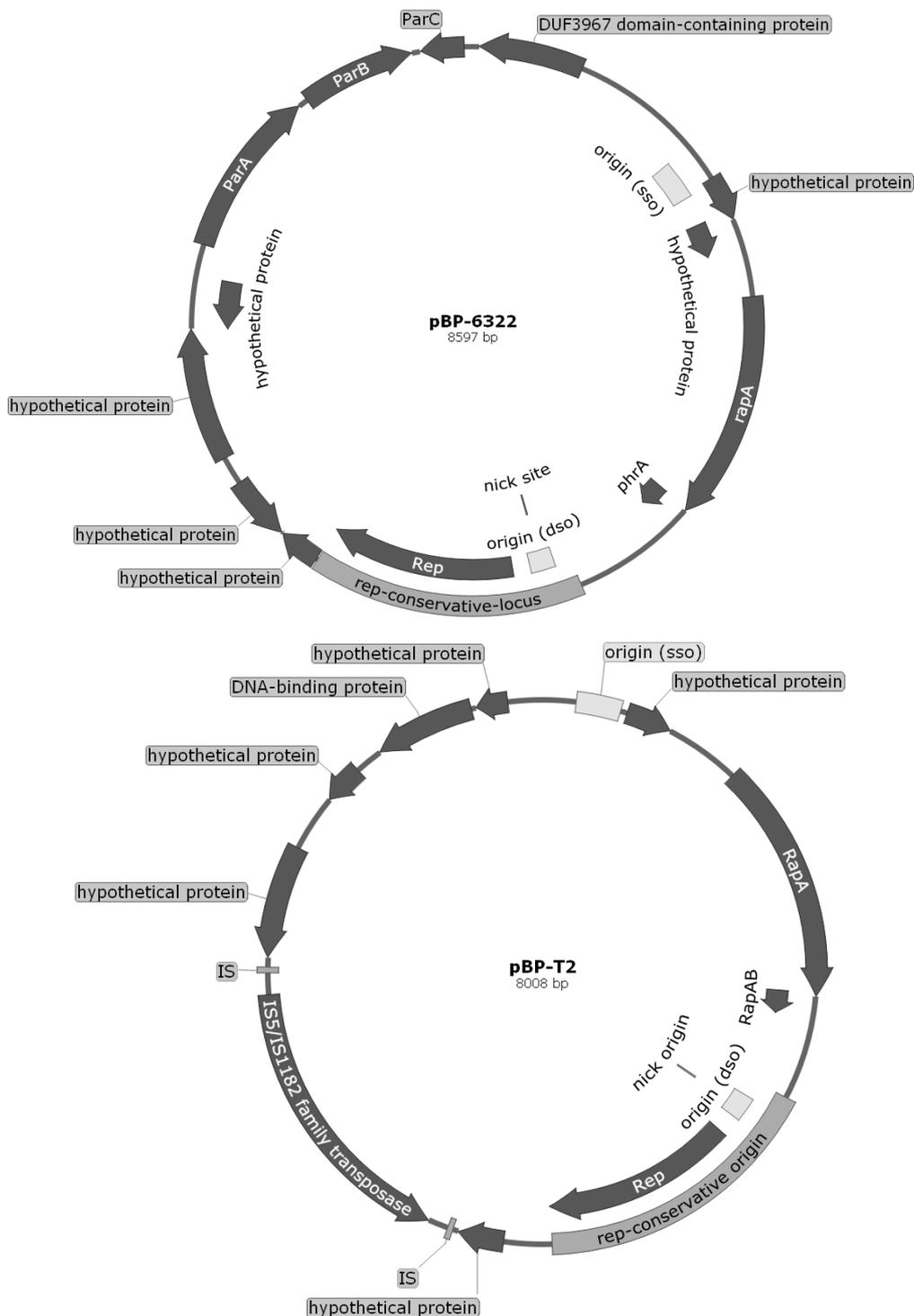


Рис. 1. Структурные карты плазмид pBP-6322 и pBP-T2.

мигрирующие элементы являются простейшей разновидностью мобильных генетических элементов и не несут никакой информации, за исключением той, которая необходима для транспозиции. Тем не менее, встраивание инсерционных элементов в бактериальную хромосому может приводить к изменению структуры регуляторных или кодирующих последовательностей. Наличие транспозиционного элемента позволяет

рассматривать плазмиду pBP-T2 в качестве перспективной основы для создания вектора для ненаправленного транспозонового мутагенеза бактерий рода *Bacillus*.

Плазида pBP-6322 также содержит в своей последовательности модули, которые не характерны для большинства известных плазмид семейства pC194. Аналогичные гены, аннотированные *parA*, *parB* и *parC* были обнаружены в плазмиде pPOD2000 (*B. subtilis*) и с помощью инсерционного мутагенеза определена их функция поддержания сегрегационной стабильности [7]. Прогнозируемые продукты всех трех модулей имеют сигнальные пептиды, ParA имеет сходство с сериновой протеазой субтилизин, ParB с высокой вероятностью несет трансмембранный домен, а возможная роль ParC – регуляция полипептидов на посттрансляционном уровне [5].

Значительное количество ОРС, имеющих высокую степень идентичности с таковыми известными плазмид бактерий *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. safensis*, не обнаруживают сходства с охарактеризованными белками, хранящимися в базе данных. В большинстве случаев они аннотированы как «гипотетический белки» и их функция на сегодняшний день не определена.

Таким образом, RCR-плазмиды бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси, характеризуются значительной генетической гетерогенностью и представляют интерес не только как потенциальные инструменты генно-инженерных манипуляций, но и в качестве объекта исследования эволюции и адаптации бактерий рода *Bacillus*.

Литература

1. Lovett, P. S. Biochemical studies of two *Bacillus pumilus* plasmids / P. S. Lovett, M. G. Bramucci // J. Bacteriol. – 1974. – Т. 120, №1 – С. 488–494.
2. Титок, М. А. Плазмиды грамположительных бактерий / М. А. Титок. – Минск: БГУ, 2004. – 130 с.
3. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1 / D. C. Garcia-Ramon [et al.] // Plasmid. – 2015. – Vol. 82 – P. 17–27.
4. Евдокимова, О. В. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси / О. В. Евдокимова, В. Е. Мямин, Л. Н. Валентович // Журнал Белорусского Государственного Университета Биология. – 2018, №1 – С. 38–49.
5. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria / W. J. Meijer [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. – 1998. – Vol. 21, №4 – P. 337–368.

6. Тойменцева, А. А. Генетические механизмы адаптации бацилл / А. А. Тойменцева, М. Р. Шарипова // Микробиология. – 2013. – Т. 82, №3 – С. 259.
7. Gleave, A. P. Use of a novel cassette to label phenotypically a cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and map loci involved in its stable maintenance / A. P. Gleave, A. Mountain, C. M. Thomas // J. Gen. Microbiol. – 1990. – Т. 136, №5 – С. 905–912.

Isolation, sequencing and comparative analysis of *Bacillus pumilus* plasmids

O. V. Evdokimova^{1*}, L. N. Valentovich^{1,2}

¹*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences
2 Kuprevich Street, 220141 Minsk, Belarus.*

²*Belarusian State University
4 Niezaliežnasci Avenue, 220030 Minsk, Belarus.*

*Email: evdokimovalesia@gmail.com

Plasmids of natural *B. pumilus* bacteria isolated in Belarus were recovered. Extrachromosomal genetic elements were divided into 7 subgroups by size and restriction profile. The complete nucleotide sequences of plasmids representing each of subgroups were determined, allowing to affiliate them to pC194 family (RCR type). Comparative analysis of nucleotide sequences and predicted amino acid sequences has revealed conservative loci typical for most plasmids of the family. The unique modules (migrating element pBP-T2 and ParABC pBR-6322) were detected.

Keywords: *Bacillus pumilus*, extrachromosomal genetic elements, plasmids.