

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

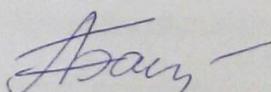
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Аздерханова Гюзель Салаватовна

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ
ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM*

Научный руководитель:

д.б.н., профессор



Баймиев Алексей Ханифович

Уфа 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Характеристика бактерий рода <i>Rhizobium</i>	9
1.2. Химическая структура ризобиальных экзополисахаридов.	10
1.3. Гены, участвующие в синтезе ЭПС у <i>R. leguminosarum</i>	12
1.4. Синтез ЭПС у ризобий.....	18
1.5. Регулирование синтеза ЭПС у <i>R. leguminosarum</i>	20
1.6. Проблемы, связанные с регулированием образования биопленок патогенных микроорганизмов	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1. Объекты исследования	27
2.2. Выделение ДНК.....	27
2.3. Культивирование и питательные среды	28
2.4. Подбор специфичных праймеров к исследуемым генам	29
2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	30
2.6. Электрофорез.....	32
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	34
3.1. Проведение анализа последовательностей генов, участвующих в биосинтезе ЭПС.....	34
3.2. Подбор специфичных праймеров к исследуемым генам	36
3.3. Выделение ризобиальной ДНК и амплификация исследуемых генов	39
3.4. Идентификация генов <i>pssA</i> , <i>pssB</i> , <i>prsD</i> , <i>prsE</i> и <i>rosR</i> у <i>R. leguminosarum</i> .	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
ВЫВОДЫ.....	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	58
ПРИЛОЖЕНИЕ	67

Список сокращений и условных обозначений

- ЭПС – экзополисахариды
ЛПС – липополисахариды
КПС – капсульные полисахариды
NF - Nod – факторы
ПБМ – перибактероидная мембрана
UDP – уридиндифосфат
IMP – инозитолмонофосфатаза
АТЛ – N-ацетил-гомосеринлактон
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ТАЕ – трис-ацетатный буфер
УМ-среда – маннитно-дрожжевая среда
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
П.н. – нуклеотидная пара

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

В род *Rhizobium* объединены почвенные бактерии, вызывающие образование специальных структур (клубеньков) на корнях бобовых растений. Внутри этих клубеньков, в условиях симбиоза ризобии способны фиксировать азот, путем восстановления атмосферного азота до аммиака ферментативным комплексом – нитрогеназой (Janczarek, 2011).

Первоначальным этапом в формировании симбиотических отношений является прикрепление ризобий к поверхности корней растения-хозяина, путем обратимого и неспецифического связывания. Такое прикрепление представляет собой начальный этап формирования ризобиями биопленок на корнях растений. Наиболее важная роль в данном процессе принадлежит кислым внеклеточным полисахаридам или экзополисахаридам (ЭПС), синтезируемые азотфиксирующими бактериями (Rinaudi et al., 2010).

Изучение биопленок в настоящее время вызывает огромный интерес исследователей, главным образом, в связи с тем, что этот способ существования бактерий создает большие проблемы в медицинской практике, поскольку они часто образуются при различных инфекционных патологиях. Течение инфекционных болезней может протекать с осложнениями именно из-за формирования в организме микробных биопленок. С биопленочными инфекциями связаны многие хронические заболевания – муковисцидозная пневмония, средний отит, патология зубов и околозубных тканей, остеомиелит, инфекции мочевыводящих путей и другие. В виду этого важно изучать процессы генетического контроля образования биопленок (Глушанова и др., 2015).

Однако, генетический контроль образования биопленок изучен недостаточно. В данном исследовании мы остановимся лишь на нескольких факторах генетической регуляции формирования бактерий и ограничимся генами: *pssA*, ответственным за инициацию биосинтеза ЭПС (Ivashina et al.,

1994), *pssB*, кодирующим инозитолмонофосфатазу (Janczarek, 2011), *rosR*, ответственным за регуляцию транскрипции (Janczarek, 2011), и *prsD* и *prsE*, отвечающим за секрецию белка NodO, который играет роль в передаче сигналов в процессе образования клубеньков (Skorupska et al., 2006).

Накопленные данные подтверждают важность генетического контроля синтеза экзополисахаридов и изучения их биологических функций в симбиотических взаимодействиях между ризобиями и растением-хозяином.

Цель исследования

Целью данной работы являлась идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий рода *Rhizobium*.

Задачи исследования

1. Проведение сравнительного анализа последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* зарегистрированных в GenBank.
2. Подбор специфичных праймеров к исследуемым генам.
3. Выделение геномной ДНК из ризобактерий.
4. Амплификация генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*.
5. Секвенирование, полученных при амплификации генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, последовательностей ДНК и их сравнение с последовательностями представленными в GenBank.
6. Скрининг штаммов *Rhizobium leguminosarum* на наличие генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*.

Обоснование новизны исследования

Для бактерий рода *Rhizobium* провели сравнительный анализ последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, зарегистрированных в GenBank. Подобрали специфичные праймера, фланкирующие структурную часть каждого гена для штаммов *Rhizobium leguminosarum*. Провели

секвенирование последовательностей ДНК, амплифицированных с помощью подобранных праймеров. Данные полученные при секвенировании исследуемых последовательностей подтвердили их идентичность с последовательностями, представленными в GenBank. Таким образом, впервые был проведен скрининг 99 штаммов *R. leguminosarum* из коллекции ИБГ УНЦ РАН. В результате скрининга был выявлен 1 штамм ризобий, содержащий все исследуемые гены, регулирующие биосинтез ЭПС. Ген *pssA*, ответственный за инициацию биосинтеза экзополисахаридов, был идентифицирован у 26 ризобиальных штаммов, ген *pssB*, кодирующий инозитолмонофосфатазу - у 21, ген *rosR*, ответственный за регуляцию транскрипции - у 31, гены *prsD* и *prsE*, отвечающие за секрецию белка NodO - у 20 и 21 ризобиального штамма соответственно.

Теоретическая значимость и практическая ценность полученных результатов

Проведенное исследование показывает оценку степени важности генетического контроля биосинтеза ЭПС в процессе образования ризобиальных биопленок. Поскольку, ЭПС играют решающую роль в прикреплении бактерий к поверхностям, в установлении симбиотических отношений с бобовыми растениями, в питании и защите от вредных факторов окружающей среды. В данной работе было показано, как наличие генов ЭПС влияет на образование биопленок.

В рамках исследования, был проведен скрининг 99 штаммов *R. leguminosarum* из коллекции ИБГ УНЦ РАН на предмет наличия у них генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез ЭПС. В результате скрининга был выявлен 1 штамм ризобий, содержащий все исследуемые гены и 23 штамма, у которых не было обнаружено ни одного из представленных генов. Такие штаммы характеризовались скудным ослизнением клеток, по сравнению с другими штаммами. Данное

исследование показало, как наличие генов, ответственных за синтез ЭПС, влияет на образование ризобиальных биопленок.

Полученные результаты раскрывают функциональную особенность каждого из исследуемых генов, участвующих в биосинтезе ЭПС в процессах, связанных с образованием ризобактериями биопленок, показывают их роль в установлении симбиотических отношений и выживании ризобактерий в естественных условиях ризосферы. Чем больше ризобии синтезируют ЭПС, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами

В медицинской практике формирование биопленок создаёт большую проблему из-за трудностей борьбы с ними. Так, методы идентификации и изучение генов, которые участвуют в образовании патогенных биопленок в организме человека, позволяют найти способ борьбы с биопленками, путём регулирования этих генов, что приведет к тому, что бактерии окажутся неспособны образовывать биопленки.

Проведенное нами исследование, свидетельствуют о существенной роли изучения генетической регуляции ЭПС не только у ризобиальных биопленок, но и у биопленок, образованными патогенными бактериями в организме человека.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика бактерий рода *Rhizobium*

Род *Rhizobium* включает в себя грамотрицательные почвенные бактерии, которые способны устанавливать симбиоз с некоторыми бобовыми растениями. При стимуляции флавоноидами, выделяющимися из корней бобовых в почву, ризобии начинают синтезировать сигнальные молекулы, которые отвечают за образование клубеньков. Эти сигнальные молекулы, называемые Nod – факторами (NF), были идентифицированы как липохитоолигосахариды. Nod - факторы провоцируют деформацию и скручивание корневых волосков, что ведет к образованию инфекционной нити, трубчатой структуры, через которую ризобии попадают внутрь корня растения-хозяина. Здесь ризобии интенсивно размножаются и образуют азотфиксирующие клубеньки (Овцына и др., 2004).

Клубеньки, образованные на корнях бобовых растений, делятся на два разных типа: недетерминированные и детерминированные. Такие бобовые культуры, как клевер, горох и люцерна, образуют клубеньки недетерминированного типа, они имеют цилиндрическую форму, с постоянной меристематической активностью, ответственной за рост клубенька на протяжении всей его жизни. Тропические бобовые, такие как соя и бобы, образуют клубеньки детерминированного типа, которые имеют сферическую форму и утрачивают меристематическую активность вскоре после образования клубенька. В обоих случаях ризобии пройдя через инфекционную нить, высвобождаются в корковые клетки и окружаются перибактероидными мембранами (ПБМ), дифференцируясь в бактериоиды (рисунок 1). Бактериоиды синтезируют азотистый комплекс и другие белки, которые позволяют им фиксировать азот и превращать его в аммиак. В свою очередь, растения поставляют бактериям углеводы в качестве источника углерода и энергии. Каждый шаг установления симбиоза тесно

контролируется через сложную сеть сигнальных каскадов (Цыганова и др., 2012).

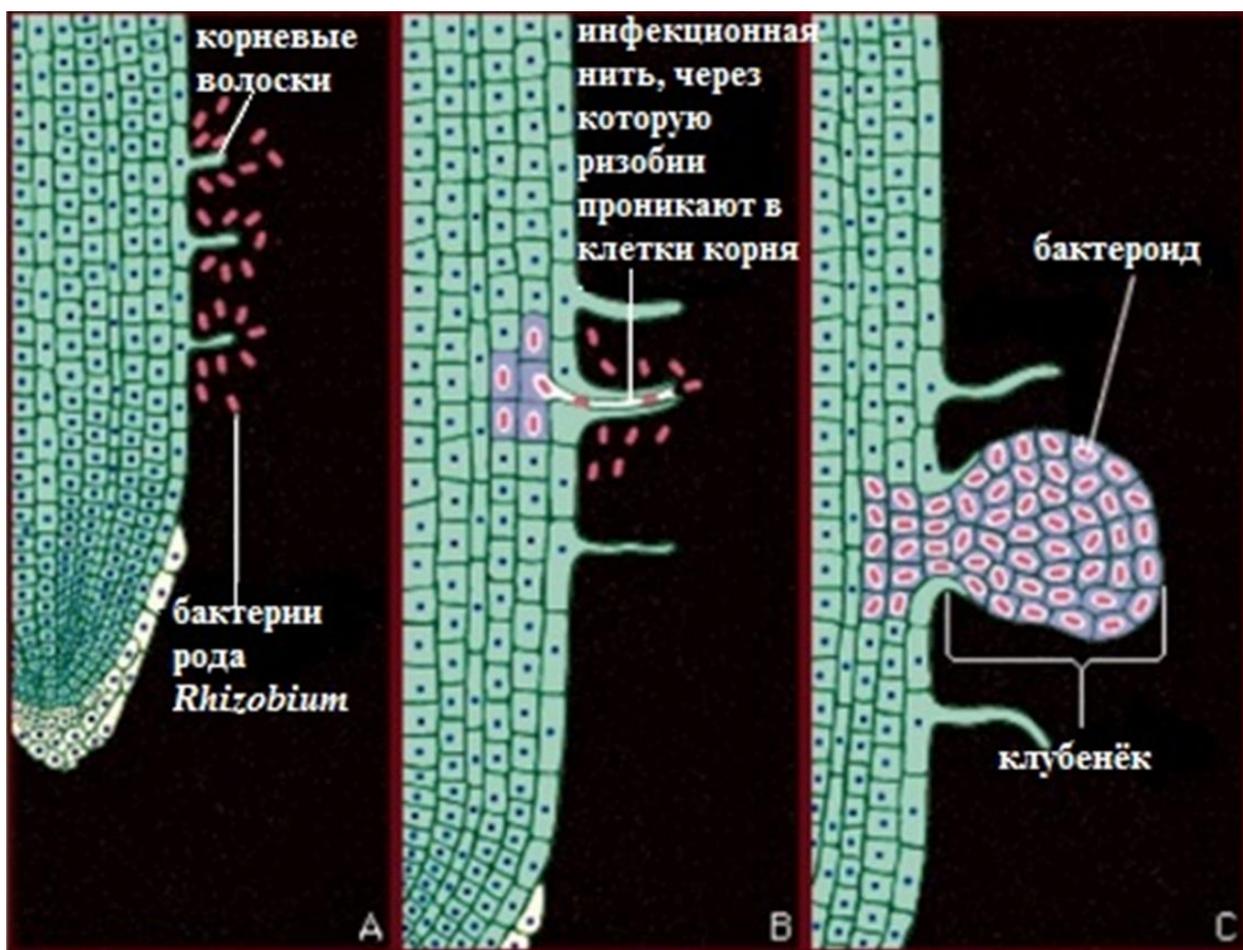


Рисунок 1 (Dewi, 2007) - Этапы формирования клубеньков: А - Белок на поверхности корневых волосков – лектин – «узнает» полисахарид наружной поверхности клеточной стенки бактерии и прочно связывается с ним; В - Проникновение бактерий внутрь клеток корня, за счет разрушения клеточной стенки ферментами растения и формирования инфекционной нити; С - Здесь ризобии активно делятся, и увеличиваясь в размерах становятся бактериоидами, что способствует формированию клубеньков

1.2. Химическая структура ризобиальных экзополисахаридов

Ризобиальные ЭПС являются видоспецифичными (или даже штаммоспецифическими) линейными или разветвленными гетерополимерами, состоящими из повторяющихся единиц, содержащих в основном обычные моносахариды (D-глюкозу, D-галактозу, D-маннозу, L-

рамнозу, D-глюкуроновую кислоту и D-галактуоновую кислоту), которые присоединяются к молекулам неуглеводной природы, (например, ацетил, пировинил, сукцинил и 3-гидроксипутаноильные группы), ответственным за кислотный характер ЭПС (Skorupska, 2006). Среди ЭПС было описано большое разнообразие в химической структуре, которое касается их состава сахаров и размера их повторяющихся звеньев, типы гликозидных связей, молекул неуглеводной природы и степени полимеризации (Frayse et al., 2003; Laus et al., 2006)

ЭПС производятся в двух формах различных молекулярных масс: в высокомолекулярной фракции, содержащей полимеры от 10⁶ до 10⁷ Да и в низкомолекулярной фракции, состоящей из мономерных, димерных и тримерных повторов. Низкомолекулярная фракция является активной биологической формой ЭПС, необходимой для успешного проникновения ризобий в клетки корня растения, образующих клубеньки недетерминированного типа (Цыганова и др., 2012).

В общем, ЭПС, синтезированные быстрорастущими ризобиями (например, *Sinorhizobium meliloti* и *R. leguminosarum*), состоят из повторяющихся единиц октасахарида, в которых глюкоза является доминирующим компонентом сахара (рисунок 2). Синтезируемые ими ЭПС имеют сходную основную структуру, но могут различаться по своим неуглеводным заместителям. ЭПС *R. leguminosarum* состоят из повторяющихся единиц, которые содержат D-глюкозу, D-глюкуроновую кислоту и D-галактозу в молярном соотношении 5: 2: 1, соединенных β -1,3 и β -1,4-гликозидными связями, и модифицированных ацетильной, пирувильной и 3-гидроксипутаноильной группами. Однако, *R. leguminosarum* штамм 248 продуцирует ЭПС, повторяющиеся звенья которого имеют дополнительный остаток глюкуроновой кислоты и отсутствие 3-гидроксипутаноильной группы (Laus et al., 2005; Janczarek, 2014).

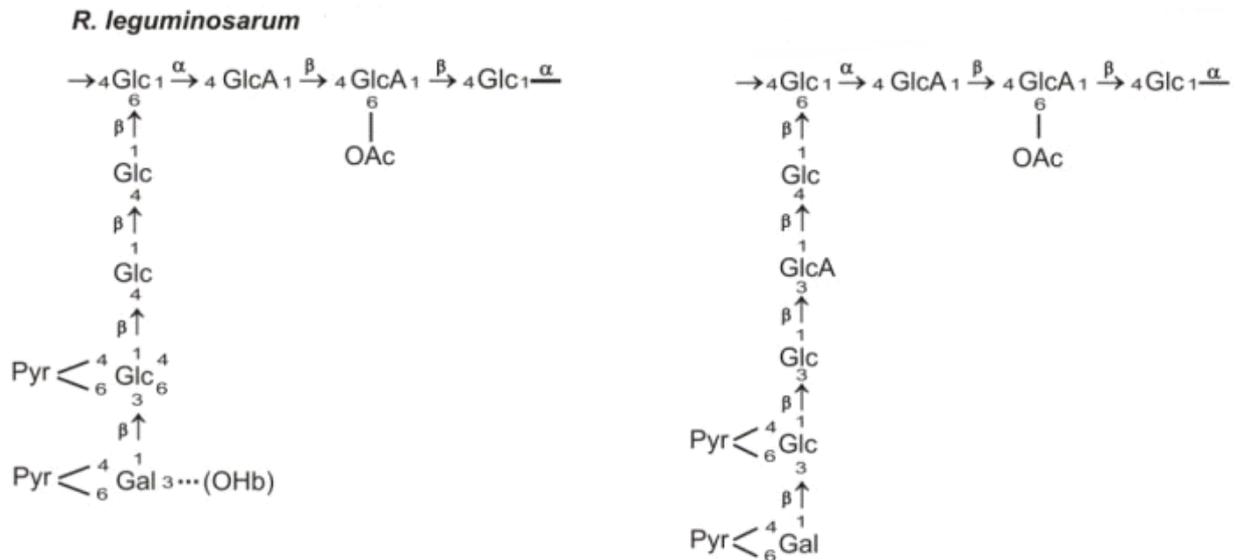


Рисунок 2 (Marczak et al., 2017) - Химические структуры повторяющихся звеньев ризобиальных ЭПС *R. leguminosarum*

1.3. Гены, участвующие в синтезе ЭПС у *R. leguminosarum*

Гены, участвующие в синтезе предшественников нуклеотидных сахаров, а также гены, участвующие в синтезе и экспорте ЭПС, расположены на хромосоме *R. leguminosarum*, и большинство из них сгруппированы в большой кластер, называемый Pss-I (рисунок 3) (Król et al., 2007).

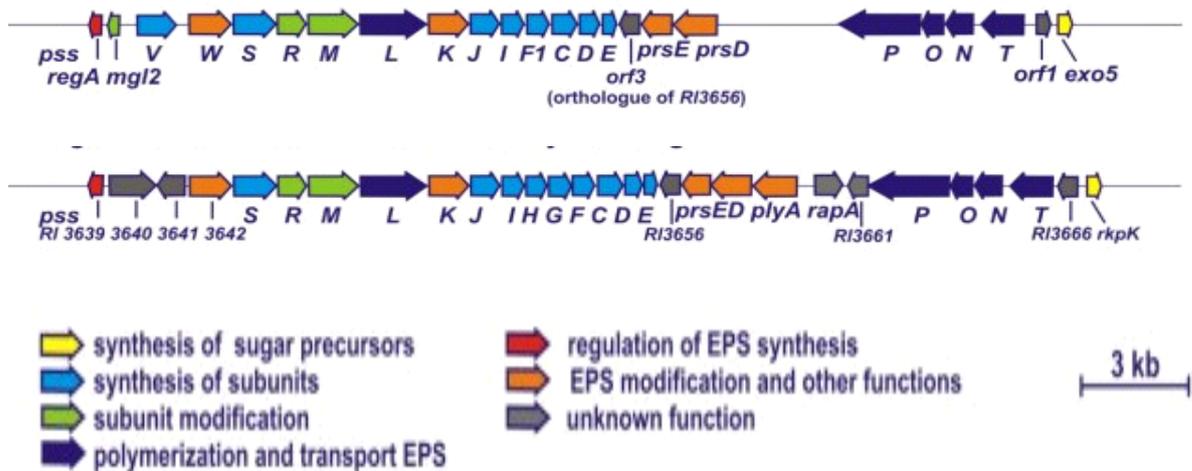


Рисунок 3 (Young et al., 2006; Król et al., 2007) – Кластерная организация генов, отвечающих за синтез ЭПС у *R. leguminosarum*

Известно два гена *exoV* и *exo5*, ответственные за синтез предшественников сахаров, которые были идентифицированы у *R.*

leguminosarum. Ген *exoB* кодирует фермент UDP-глюкоза-4-эпимеразу, необходимую для синтеза UDP-галактозы, которая является донором этого сахара в синтезе ЭПС и других полисахаридов, содержащих галактозу. Мутант по гену *exoB* продуцирует ЭПС, лишенные галактозы в повторяющихся единицах и почти полностью не способен проникать в корни растений-хозяев, вызывая образование аномальных клубеньков. Ген *exo5*, расположенный в кластере Pss-I, кодирует UDP-глюкозодегидрогеназу, которая отвечает за превращение UDP-глюкозы в UDP-глюкуроновую кислоту. Мутант по гену *exo5* проявляет плейотропные эффекты, включая изменения в оболочке бактериальных клеток и ухудшение симбиоза (Laus et al., 2004). Мутант по гену *exo5* не способен синтезировать ни UDP-глюкуроновую, ни UDP-галактуроновую кислоту, и, как следствие, не производит ЭПС (Muszyński et al., 2011).

Ген *pssA*, кодирует белок, участвующий в первом этапе синтеза октасахаридной субъединицы. Он представляет собой одну открытую рамку считывания и расположен на большом расстоянии от других генов *pss*. Этот ген кодирует активность интегрального мембранного белка глюкозил-IP-трансферазы, который переносит глюкозо-1-фосфат из UDP-глюкозы на липидный носитель. Ген *pssA* является очень консервативным геном, который присутствует не только у бактерий вида *R. leguminosarum* (Janczarek et al., 2003), но и у других близкородственных видов, таких как *Rhizobium etli* и *Rhizobium gallicum* (Janczarek et al., 2009). Мутации гена *pssA* полностью подавляют продукцию ЭПС и приводят к индукции пустых (без бактерий) клубеньков недетерминированного типа на корнях растений-хозяев (клевера, гороха и горошка) (Janczarek et al., 2009). Транскрипция *pssA* находится на очень низком уровне, что говорит о том, что экспрессия этого ключевого гена для синтеза ЭПС находится под очень строгим регулированием (Janczarek et al., 2004). Кроме того, внутри клубеньков экспрессия гена *pssA* находится на очень низком, почти неопределяемом уровне (Жуков и др., 2008).

Последующие этапы сборки повторяющегося блока включают белки, кодируемые генами *pss*, расположенными в кластере Pss-I. Эта область длиной 35 Кб, охватывает более 20 генов, высоко сохраняется среди всех до сих пор секвенированных геномов штаммов *R. leguminosarum* (Young et al., 2006; Król et al., 2007; Reeve et al., 2010) и близкородственного штамма *R. etli* (González et al., 2006). Добавление второго субстрата сахара в субъединицу катализируется глюкуронозил- β -1,4-глюкозилтрансферазой, кодируемой двумя генами этой области – *pssD* и *pssE* (Janczarek et al., 2017). Мутант по гену *pssD* демонстрирует очень похожий фенотип мутанта по гену *pssA*; он не продуцирует ЭПС и образует азотсодержащие клубеньки на растениях-хозяевах, в которых почти нет бактерий. Мутации генов *pssD* и *pssE* еще более выраженнее гена *pssA* проявляют также другие эффекты, в том числе различия в уровнях синтеза нескольких белков (Janczarek et al., 2003) и профилей ЛПС по сравнению с родительским штаммом (Kutkowska et al., 2011).

Третий этап повторного модульного синтеза осуществляется глюкуронозил- β -1,4-глюкуронозилтрансферазой, кодируемая геном *pssC*. Мутация в данном гене приводит к более чем двукратному уменьшению производства ЭПС и индукции азотфиксирующих клубеньков на корнях клевера, в то время как на горошке клубеньки не образуются (Janczarek et al., 2011).

До сих пор ферменты, участвующие в следующих этапах синтеза ЭПС, не были охарактеризованы, хотя весьма вероятно, что некоторые из *pss*-генов, расположенных в кластере Pss-I, которые кодируют предполагаемые гликозилтрансферазы (например, *pssF*, *pssG*, *pssH*, *pssI*, *pssJ* и *pssS*) могут участвовать в этом процессе (Król et al., 2007). Другие *pss*-гены, присутствующие в этом кластере, такие как *pssR*, кодирующие предполагаемую ацетилтрансферазу и *pssM*, кодирующие кетальпируваттрансферазу, наиболее вероятно участвующую в добавлении несахарных заместителей к субъединицам ЭПС. Недавно была подтверждена

роль гена *pssM* в модификации ЭПС и симбиоза *R. leguminosarum* с растениями гороха. Мутация этого гена приводила к отсутствию пирувильных групп на субтерминальной глюкозе в повторяющихся звеньях. В результате этого изменения состава ЭПС, бактерии вызывают неазотирующие клубеньки на растениях-хозяевах. Клубеньки, индуцированные мутантом по гену *pssM*, показали нормальную инвазию и высвобождение бактерий в растительные клетки, но их дифференцировка на бактериоиды была нарушена (Ivashina et al., 2010). Эти данные подтверждают, что этот тип модификации ЭПС у *R. leguminosarum* имеет решающее значение для его биологической функции при установлении эффективного симбиоза.

Кроме того, у *R. leguminosarum*, был идентифицирован ген *exo-344*, кодирующий гликозилтрансферазу, ответственную за добавление галактозного остатка, который может быть задействован на последнем этапе сборки субъединицы. Мутант по гену *exo-344* демонстрирует фенотип, очень похожий на мутанта по гену *exoB*, поскольку он продуцирует только мономерные единицы, не имеющие терминальной галактозы (Skorupska et al., 2006).

Полимеризация и экспорт бактерий, находящихся вне ЭПС, осуществляются системой секреции, состоящей не менее чем из трех белков, кодируемых генами *pssT*, *pssN* и *pssP* оперона *pssTNOP* (Król et al., 2007). Белок PssP, демонстрирующий значительную идентичность с *S. meliloti* ExoP и другими мембранно-периплазматическими вспомогательными белками, участвующими в синтезе высокомолекулярной фракции ЭПС I и капсульных полисахаридов (КПС), является основным компонентом этой системы (Mazur et al., 2002). Аналогично фенотипу мутанта по гену *exoP* *S. meliloti* делеция гена *pssP* полностью отменяет продукцию ЭПС у *R. leguminosarum*. PssT представляет собой интегральный белок внутренней мембраны, подобный Wzy-подобным белкам, а мутация в этом гене приводит к перепроизводству ЭПС (Mazur et al., 2003). Третий компонент этой системы секреции –

липопротеин PssN, является наружным мембранным белком, направленным в периплазматическое пространство его N-концевой сигнальной последовательностью (Marczak et al., 2006). Кроме того, PssL-белок, который демонстрирует значительное сходство с флиппазами Wzx-типа, участвующими в транслокации O-антигена из внутренней мембраны во внешнюю, также может быть компонентом этого комплекса (Mazur et al., 2006).

pssO – другой ген оперона *pssTNOP*, кодирует белок, уникально найденный у *R. leguminosarum* и *R. etli*, который выделяется вне бактерий и остается прикрепленным к клеткам (Marczak et al., 2008). Мутант по гену *pssO* не продуцирует ЭПС и образует клубеньки, неэффективные при фиксации азота на корнях клеверных растений, что указывает на то, что этот белок важен для синтеза и / или переноса ЭПС, хотя его функция в этом процессе точно не установлена.

Также *pssB*, расположенный выше гена *pssA*, по-видимому, участвует в отрицательной регуляции синтеза ЭПС; однако его точная роль в этом процессе трудно установить. Мутант по гену *pssB* продуцирует большее количество ЭПС, чем дикий тип, и индуцирует клубеньки, не способные фиксировать азот на корнях клевера и горошка, тогда как дополнительные копии этого гена приводят к увеличению производства ЭПС. Ген *pssB* кодирует белок, принадлежащий к семейству инозитолмонофосфатаз (IMP-ases), охватывающий ферменты как прокариотических, так и эукариотических организмов (Kutkowska et al., 2007). В клетках млекопитающих инозитолмонофосфатазы ответственны за превращение монофосфата инозита в инозитол, который необходим для регенерации фосфолипидов, содержащих инозитол. Но роль инозитолмонофосфатаз в метаболизме ризобий неясна. Этот фермент может генерировать пул инозита, который является соединением, обычно встречающимся внутри бактериоидов *R. leguminosarum*, а также обильно встречаются в клубеньках гороха. С другой стороны, катаболизм инозита, по-видимому, важен для

выживания и конкуренции ризобийных штаммов, что имеет решающее значение для успешного проникновения ризобий в клетки корня растения-хозяина (Janczarek et al., 2011).

Помимо генов *pss*, упомянутых выше, есть и другие гены, необходимые для синтеза ЭПС, но не обязательно непосредственно вовлеченные в этот процесс. Они также присутствуют в кластере *Pss-I*. К ним относятся гены *plyA* и *prsD* и *prsE*, расположенные близко к оперону *pssCDE* (Król et al., 2007). Гены *prsD* и *prsE* кодируют компоненты системы секреции белка типа I, которая сохраняется во всех биоварах *R. leguminosarum*. Эта система секреции проявляет атипичную широкую субстратную специфичность, экспортируя по меньшей мере 13 субстратов, среди которых гликаназы (*PlyA*, *PlyB* и *PlyC*), ризобийные адгезионные белки (*RapA2*, *RapB* и *RapC*) и белок *NodO*. Гликозилгидролазы *PlyA* и *PlyB* расщепляют ЭПС, влияя на его обработку (Krehenbrink et al., 2008). Мутант по гену *prsD* продуцирует ЭПС с более высокой степенью полимеризации, чем штамм дикого типа, и вызывает большее количество узлов, неспособных к фиксации азота (Russo, 2006).

Ген *rosR*, который, как представляется, играет ключевую роль в регуляции синтеза ЭПС среди всех описанных регуляторных генов, был идентифицирован на хромосоме *R. leguminosarum* (Janczarek et al., 2007). Данный ген очень консервативен и присутствует в геномах штаммов, принадлежащих к виду *R. leguminosarum*, а также у близкородственных видов *R. etli* и *R. gallicum*, что указывает на его важную регуляторную роль у других ризобийных видов (Janczarek et al., 2009). У *R. leguminosarum* ген *rosR* также имеет значительную идентичность с геном *ros* у *Agrobacterium tumefaciens*, с геном *rosAR* у *A. Radiobacter* и с геном *mucR* у *S. meliloti*. Все эти гены кодируют регуляторы транскрипции, принадлежащие к семейству белков Ros / MucR, которые имеют мотивы цинкового пальца Cys2His2 и участвуют в регуляции синтеза ЭПС. Генетический скрининг генома показывает, что белок RosR у *R. etli* влияет на экспрессию многих

функционально разнообразных генов, в том числе тех, которые ответственны за синтез и модификацию поверхностных полисахаридов (*exoB*, *prsD*, *pskK* и *plyA*) (Janczarek et al., 2011). Мутация гена *rosR* у *R. leguminosarum* способствует к существенному снижению производства ЭПС и к неэффективному симбиозу с клевером, тогда как дополнительные копии этого гена приводят к почти двукратному увеличению синтеза ЭПС (Janczarek et al., 2007; Janczarek et al., 2009), что указывает на то, что ген *rosR* функционирует как положительный регулятор этого процесса. Кроме этого, мутант по гену *rosR* проявляет несколько других эффектов, включая снижение отношения низкомолекулярной к высокомолекулярной фракциям ЭПС, количественные изменения в полисахаридной составляющей ЛПС, изменения в мембранах и секретируемых профилях белка, повышенную чувствительность к поверхностно-активным детергентам и некоторым осмолитам, и снижение подвижности и конкурентоспособности клубеньков (Janczarek et al., 2010). Но самым ярким эффектом мутации гена *rosR* является значительное снижение прикрепление и колонизации корневых волосков, что указывает на то, что мутация в этом гене влияет на первые шаги процесса инвазии. С другой стороны, несколько копий гена *rosR* значительно повышают конкурентоспособность и образование клубеньков у *R. leguminosarum*, подтверждая существенную роль этого гена в симбиозе (Janczarek et al., 2007).

1.4. Синтез ЭПС у ризобий

Подобно другим бактериям, синтез ЭПС в ризобиях представляет собой многостадийный процесс, требующий скоординированной активности многих ферментных белков. Гены, участвующие в этом процессе, обычно группируются в крупные кластеры и расположены на ризобиальных хромосомах или мегаплазмидах (González et al., 2006; Young et al., 2006; Król et al., 2007, Reeve et al., 2010). К ним относятся гены, кодирующие ферменты, необходимые для синтеза предшественников нуклеотидных сахаров,

ферменты, участвующие в единичной сборке и модификации, и белки, ответственные за полимеризацию повторяющихся звеньев и транспортировку ЭПС бактерий (Skorupska, 2006). Биосинтез ЭПС зависит от активности белкового комплекса, локализованного как во внутренней (IM), так и в наружной мембранах (OM). Ундекапренил-фосфат, закрепленный во внутренней мембране, является акцептором сахара для синтеза ЭПС и других бактериальных гетерополисахаридов. Нуклеотидные дифосфосахара, служащие в качестве предшественников, последовательно связываются с акцептором с помощью специфических гликозилтрансфераз, в результате чего происходит рост полисахаридной цепи. Затем субъединицы переворачиваются через внутреннюю мембрану к периплазматическому пространству действием Wzx-подобной транслоказы (Whitfield et al., 2003; Marolda et al., 2006; Islam et al., 2013). Полимеризация повторяющихся единиц, скорее всего, связана с экспортом растущей цепи полимера на поверхности бактерий. Этот процесс включает активность Wzy-подобной полимеразы и Wzc-подобного внутреннего мембранно-периплазматического вспомогательного белка. (Marolda et al., 2006; Woodward et al., 2010).

В ризобиях процесс синтеза ЭПС очень сложен и регулируется как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях, с множеством регуляторных систем, которые до настоящего времени лучше всего изучались у двух видов: *S. meliloti* и *R. leguminosarum*. Адаптация синтеза ЭПС к различным условиям окружающей среды требует сложной регулирующей сети, включающей перекрестные переговоры между различными регулируемыми компонентами. Несколько факторов окружающей среды и стрессовых условий, таких как осмолярность среды, доступность аммония и фосфата, а также флавоноиды, влияют на биосинтез ЭПС (Janczarek et al., 2011). Кроме того, другие условия культивирования, такие как тип источника углерода и возраст культуры, могут изменять количество и состав производимого ЭПС (Quelas et al., 2006).

1.5. Регулирование синтеза ЭПС у *R. leguminosarum*

До сих пор было описано лишь несколько регуляторных генов, участвующие в процессе биосинтеза ЭПС. К ним относятся два гена *psiA* и *psrA*, расположенные на симбиотических мегаплазмидах (pSym) и гены *exoR*, *pssB*, *rosR* и *expR*, расположенные на хромосоме *R. leguminosarum* (рисунок 4) (Edwards et al., 2009).

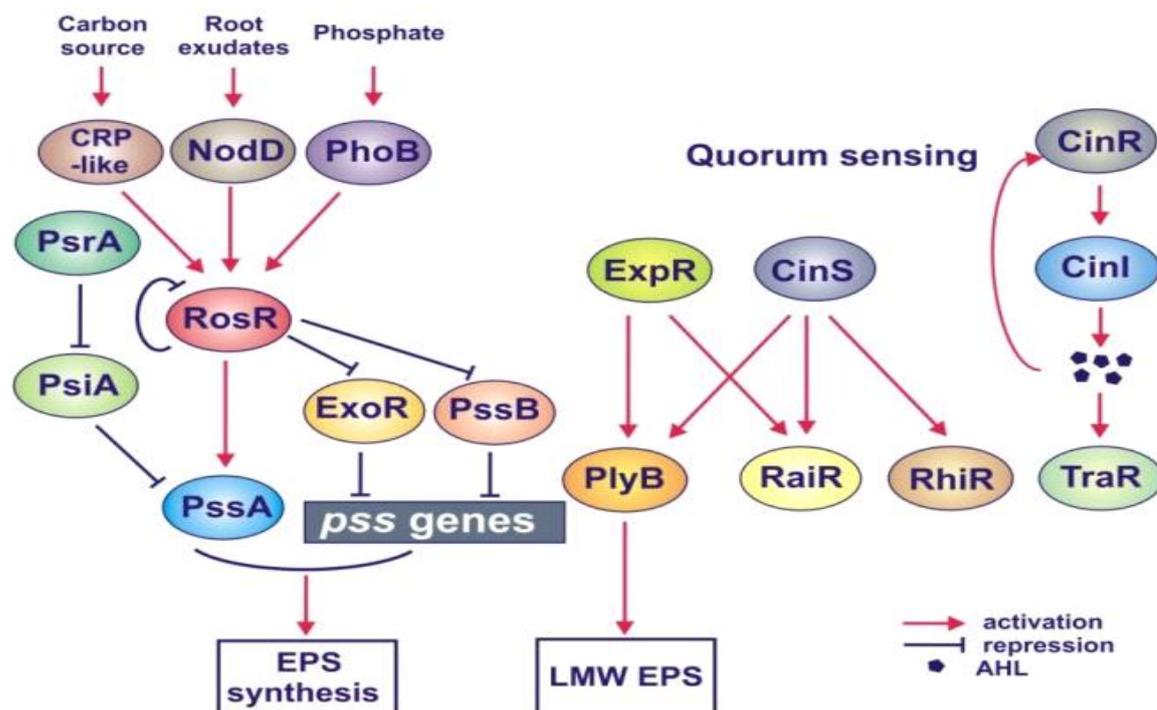


Рисунок 4 (Janczarek et al., 2011) - Модель регуляции синтеза ЭПС у *R. leguminosarum*

psiA (ген ингибирования синтеза ЭПС) и *psrA* (ген восстановления синтеза ЭПС), первый из которых идентифицируется среди этих генов, были найдены на мегаплазмиде pSym *R. leguminosarum*, вблизи *nod-nif* областей, участвующих в узловой и азотной фиксации (Skorupska, 2006). Хотя мутация в гене *psiA* не влияет на продукцию ЭПС, дополнительные копии этого гена предотвращают синтез ЭПС и образование клубеньков у фасоли. Ингибирующий эффект дополнительных *psiA*-копий преодолевается при наличии нескольких копий *psrA* или *pssA* генов, кодирующих глюкозил-IP-

трансферазу, участвующую в первой стадии синтеза ЭПС (Janczarek et al., 2011). Это указывает на то, что для правильной продукции ЭПС требуется сбалансированное количество копий *psiA*, *pssA* и *psrA*. Ген *psiA* кодирует небольшой внутренний мембранный белок, который показывает сходство с регулятором EhoX у *S. meliloti*. Также белок PssA, содержащий гидрофобный N-концевой конец и домен трансмембранной спирали, расположен во внутренней мембране. Такая же субклеточная локализация белков PsiA и PssA предполагает, что PsiA, скорее всего, функционирует как посттрансляционный ингибитор PssA, который связывает и ингибирует активность этого фермента (Ksenzenko et al., 2007).

Второй регулятор PsrA принадлежит к семейству регуляторов транскрипции, содержащий мотив «спираль-поворот-спираль», который подавляет транскрипцию гена *psiA*. Мутант по гену *psrA* продуцирует уменьшенное количество ЭПС по сравнению со штаммом дикого типа, что указывает на положительную роль этого гена в синтезе ЭПС. Оба штамма с множественными копиями мутаций генов *psrA* и *psiA* демонстрируют сходные симбиотические фенотипы – они вызывают образование неадгезивных клубеньков на растении-хозяине. Эти данные свидетельствуют о том, что ген *psiA*, скорее всего, ингибирует продукцию ЭПС в клубеньках посредством репрессии гена *psrA* (Janczarek et al., 2009).

Производство ЭПС у *R. leguminosarum* также отрицательно регулируется геном *exoR*, что показывает значительное сходство с *exoR* *S. meliloti*. У *R. leguminosarum* мутант по гену *exoR* производит в 3 раза больше ЭПС, чем штамм дикого типа, аналогично мутанту *S. meliloti* (Reeve et al., 2010), но в отличие от этого последнего мутанта, он индуцирует как эффективные, так и неинфекционные клубеньки на корнях гороха.

1.6. Проблемы, связанные с регулированием образования биопленок патогенных микроорганизмов

Микробное сообщество, состоящее из прикрепленных к поверхности или к друг другу клеток, которые заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, называется биопленкой. В этом состоянии бактериальные клетки очень устойчивы к стрессам, включая антибактериальное лечение и дезинфекцию (Глушанова и др., 2015). В связи с большей агрессивностью патогенных микроорганизмов по сравнению с комменсалами происходит преимущественное заселение ими любых инородных тел, вводимых в организм человека. Биоплёнки образуются на постоянных катетерах, эндоскопах, внутренних имплантатах, контактных линзах и протезах. В наибольшей степени адгезии микроорганизмов способствуют полиэтиленовые и поливиниловые устройства, в наименьшей – силиконовые, тефлоновые и полиуретановые, однако до настоящего времени не существует материалов, применение, которых одновременно было безвредно для макроорганизма и исключало бы биологическое обрастание (Доброхотский и др., 2008). Специальные исследования показали, что в биопленке по-иному, в сравнении с чистыми культурами бактерий, происходят их многочисленные физиологические процессы, в том числе продукция метаболитов и биологически активных веществ. Сообщество организует единую генетическую систему в виде плазмид-кольцевых ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их пищевые (трофические), энергетические и другие связи между собой и внешним миром. Последнее получило специальное определение как социальное поведение (*quorum sensing*) микроорганизмов. Реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биопленке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Такая организация обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и, следовательно, является залогом

конкурентного выживания в экологической нише. В организме человека специфическое преимущество такой организации заключается в обеспечении гомеостаза органов, функциональность которых зависит от населяющих их микробов. Преимущество коллективного реагирования имеет и отрицательную сторону: таким сообществом трудно управлять извне. Например, лечить заболевания полимикробного происхождения, когда чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, ассоциированных в биопленку, не соответствует таковой, определенной в лабораторных тестах на клинических изолятах чистых культур бактерий. Коллективный иммунитет биопленки практически сводит на нет возможность коррекции дисбактериозов с помощью пробиотиков (препаратов живых культур ключевых микроорганизмов кишечника: бифидобактерий, лактобацилл, энтеробактерий и других) (Честнова и др., 2009).

К настоящему времени накопилось значительное количество данных о том, что микроорганизмы в составе биоплёнки влияют на течение хронических воспалительных заболеваний. Биопленки обладают высоким уровнем толерантности к антителам, антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и фагоцитам (Афиногенова и др., 2012). К сожалению, стандартные методы антибактериального лечения направлены на отдельно существующие планктонные клетки, тогда как бактерии внутри биоплёнки размножаются и вновь диссеминируют после завершения курса лечения, нередко формируя очаги хронической персистирующей инфекции, способствуя рецидивированию заболевания (Lewis et al., 2005).

К числу заболеваний, связанных с присутствием биоплёнок, относят инфекции мочевых путей (вызванные *E. coli* и другими бактериями), мочекаменную болезнь, катетер-ассоциированные инфекции кровотока – КАИК (золотистый и коагулазонегативные стафилококки, другие бактерии и грибы рода *Candida*), стоматологические проблемы (зубной камень, кариес, гингивит), хронический простатит, инфекции среднего уха у детей (обусловленные, например, *Haemophilus influenzae*), хронический синусит,

хроническую обструктивную болезнь лёгких (ХОБЛ), муковисцидоз, инфекционный эндокардит, хронический остеомиелит, инфекции протезированных клапанов и суставов и т.д. (Parsek et al., 2003). Все эти заболевания трудны для лечения, имеют высокую частоту рецидивов и некоторые из них могут явиться причиной летальных исходов.

Показано, что бактерии в биопленках могут обмениваться плазмидами, содержащими гены, ответственные за их резистентность к антибиотикам. В своих исследованиях Робертс с соавторами описал обмен плазмидами между различными родами микроорганизмов полости рта. Физическая близость клеток в биопленках облегчает обмен плазмидами по тому же механизму, что и среди планктонных микроорганизмов. Показано что обмен плазмидами между разными видами *Pseudomonas* были значительно выше в биопленках, чем для тех же микроорганизмов во взвешенной культуре. Появление резистентных микроорганизмов особенно опасно в случае их роста и размножения в условиях стационара, поскольку они способны распространяться от пациента к пациенту через руки медперсонала (Белобородова и др., 2009).

Сейчас не вызывает сомнений необходимость пересмотра концепции патогенеза различных хронических инфекций, используя имеющиеся данные о биопленках. В практическом отношении это требует внедрения новых методов диагностики и лечения. (Dowd et al., 2008).

Среди методов борьбы с биопленками выявлена новая мишень – внеклеточная ДНК матрикса биопленок для воздействия на бактерии с целью повышения эффективности антибиотикотерапии. Использование ДНК матрикса, как дополнительной мишени при терапии, позволяет повысить эффективность действия различных антибиотиков на неродственные микробы, находящиеся в биопленках, снизить вероятность возникновения, распространения и сохранения устойчивости к лечебному агенту, сократить общую продолжительность терапии, уменьшить сроки пребывания больных в стационаре и снизить частоту рецидивов заболевания (Тец,и др., 2007).

Большое количество лабораторий в настоящее время пытается выявить гены, которые экспрессируются или наоборот репрессируются во время начального формирования биопленок, что также может служить отправной точкой для появления диагностических тестов или выработки стратегии подавления биопленок на генном уровне. Так, в одной из работ исследователи (Ealand et al., 2018) изучали способность штаммов *Mycobacterium smegmatis* (быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий) без генов *rpf* образовывать биопленки и тестировали их восприимчивость к агентам, нацеленным на клеточные стенки. *M. smegmatis* кодирует четыре различных гомолога *rpf*, а именно MSMEG_5700 (*rpfA*), MSMEG_5439 (*rpfB*), MSMEG_4640 (*rpfE2*) и MSMEG_4643 (*rpfE*). В результате удаления генов *rpf* наблюдались изменения в морфологии колоний и невозможность образования типичных биопленок. Более того, у штаммов, не имеющих *rpfA* и *rpfB*, одновременно наблюдалась повышенная восприимчивость к рифампицину, ванкомицину и SDS. Таким образом, исследователи продемонстрировали, что прогрессивное удаление генов *rpf* препятствует развитию биопленок и снижению толерантности к лекарственным средствам. Все это сопровождалось снижением продуцирования муропептида и изменением пептидогликанового сшивания (Ealand et al., 2018). В совокупности эти наблюдения указывают на важную роль генов в микобактериальной коммуникации и лекарственной толерантности.

Анализ имеющихся литературных данных убедительно демонстрирует роль биоплёнок в патогенезе воспалительных заболеваний и их участие в хронизации воспалительного процесса. Полученные в ходе исследований разных авторов данные, имеют важное значение для понимания патогенеза воспалительных заболеваний и новым подходам к терапии хронических инфекций. Воздействие на биопленки может быть направлено на блокирование механизмов адгезии бактерий к поверхности, синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными

агентами. Результаты исследований по данным направлениям приносят положительные результаты и внедряются в клиническую практику. Безусловным является пересмотр современных представлений о патогенезе воспалительных заболеваний с позиций имеющихся данных о микробных биоплёнках (Доброхотский и др., 2008).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись гены *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующие биосинтез ЭПС у бактерий рода *Rhizobium*, а также 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН. Штаммы были изолированы из клубеньков 6 видов дикорастущих бобовых растений, представленных в таблице 1.

Таблица 1 - Список растений, из клубеньков которых были изолированы штаммы

Растение-хозяин	Количество штаммов
Горошек заборный 9 / <i>Vicia sepium</i>	12
Горошек лесной 7 / <i>Vicia sylvatica</i>	11
Чина лесная 1 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12
Чина лесная 2 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12
Чина лесная 3 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10
Чина лесная 4 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10
Чина гороховидная 4 / <i>Lathyrus pisiformis</i>	12
Чина луговая 5 / <i>Lathyrus pratensis</i>	10
Чина Литвинова 3 / <i>Lathyrus litvinovii</i>	10

2.2. Выделение ДНК

Для выделения ДНК микроорганизмов использовали ионообменную смолу Chelex100, приготовленную с использованием следующих реагентов: Triton X-100 (1%), Tween-20 (1%), Chelex 100, TRIS-HCl (pH 9,1, 100 mM), крезоловый красный и ddH₂O. Для этого растворяли 0,5 г Chelex 100, 5 мл

TRIS-HCl и 0,5 мл Triton X-100 в 50 мл в ddH₂O. Добавляли щепотку красителя крезолового красного и перемешивали до полного растворения. Во время использования постоянно перемешивали готовый реактив для растворения частичек, осевших на дно.

Для выделения ДНК бактерий было отобрано необходимое количество одноразовых пробирок типа Eppendorf объемом 1,5 мл, которые размещались в штативе и промаркировывались. Стерильной бактериальной петлей брали небольшое количество бактерий и помещали на стенку эппендорфа. Затем, в каждую пробирку с бактериями одним наконечником добавляли по 200 мкл смолы Chelex. Содержимое пробирок тщательно ресуспендировали на Wortex. Инкубировали в термостате в течение 10 минут при температуре 95°C. После окончания инкубации повторно перемешивали содержимое пробирок на Wortex, а затем центрифугировали пробирки на микроцентрифуге при максимальных оборотах 5 минут. Надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК.

В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации нужных генов (*pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD* и *prsE*), регулирующих биосинтез ЭПС у *R.leguminosarum*, выявляемые методом ПЦР.

2.3. Культивирование и питательные среды

Бактерии рода *Rhizobium* достаточно легки в культивировании и не особо привередливы по своим требованиям к питательным средам. Почти все ризобии легко используют моносахариды и дисахариды, и в меньшей степени трисахариды, спирты и кислоты. Сахароза и маннит - это, вероятно, наиболее часто используемые источники энергии. А также растительные экстракты, таких растений как люцерна, капуста, горох и кукуруза считаются полезными для роста ризобий. Эти экстракты и гидролизаты могут также обеспечивать углеводы для роста ризобий. Наиболее часто используемой добавкой фактора роста для ризобий является дрожжевой экстракт (таблица 2).

Среда ҮМ (NJҮМ).

Таблица 2 - Состав среды ҮМ

Ингредиенты	Вес (На 100 мл Н2О дист.)
Дрожжевой экстракт	0.4 г
Маннит	1 г
CaCO ₃ 10%	30 мкл
Агар-агар (для твердых питательных сред)	1,5 г
Растворы солей:	
MgSO ₄ –	1 мл
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O×0.05	1 мл
NaCl	1 мл

Для приготовления среды ҮМ сначала размешивали 0.4 г дрожжевого экстракта, 1,5 г агар-агара и 1 г маннита в 100 мл дистиллированной воды. Затем добавляли 30 мкл CaCO₃ 10%. В конце в полученную смесь добавляли по 1 мл растворов солей: NaCl, MgSO₄, K₂HPO₄ × 3 H₂O×0.05. После чего подогревали до кипения для полного растворения частиц. Стерилизовали автоклавированием при 120 °С в течение 30 мин. Ризобии инкубировали в течение 2 суток при температуре 28°С.

2.4. Подбор специфичных праймеров к исследуемым генам

При подборе праймеров к исследуемым генам мы принимали во внимание несколько параметров, среди которых были: длина праймера (15-30 нуклеотидов), температура плавления (T_m) (55-72 °С), разница температур отжига (не более 2 °С), специфичность, комплементарная последовательность праймеров, GC - состав не менее 50%.

Поиск заданной последовательности ДНК проводили в GenBank., на базе данных NCBI. Для этого в окошке Search открывали вкладку Nucleotide и вводили в поле название искомого микроорганизма - *Rhizobium*

leguminosarum вместе с интересующим нас геном, и осуществляли поиск последовательности. Выданную нуклеотидную последовательность копировали в буфер обмена, а затем вставляли в окно программы EditSeq пакета Lasergene и сохраняли файл.

Подбор специфичных праймеров производили в программе PrimerSelect. В запущенной программе PrimerSelect в меню File выбирали Enter sequence, и вставляли нужный файл с нуклеотидной последовательностью. Для настройки основных характеристик праймеров и ампликонов запускали меню Conditions. В подменю Primer Characteristics устанавливали желаемую температуру плавления праймеров, а так же длину и размеры шпилек и димеров. В подменю Primer Locations устанавливали размер ампликона. Для автоматического подбора праймеров по указанным характеристикам переходили в меню Locate и выбирали Primers&Probes. Для копирования нуклеотидной последовательности праймера мы снова открывали последовательность, используя программу EditSeq, и копировали указанные участки цепи ДНК.

2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Аmplификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2», «ДНК-технология», г. Москва.

Перед началом работы располагали в штативе буфер Taq-полимеразы, dNTP, растворы праймеров для разморозки, затем ресуспендировали на вортексе. Пока компоненты для реакционной смеси оттаивали мы отбирали необходимое количество пробирок типа Eppendorf объемом 0,6 мл, промаркировывали и расставляли в штатив соответствующим образом. Реакционную смесь для общего количества анализируемых проб готовили в отдельной пробирке на 1,5 мл и вносили по 22 мкл в каждую пробирку для амплификации. Состав реакционной смеси для 1 пробирки составлял: 2,5 мкл 10× Taq – буфера, 2,5 мкл раствора дидеоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP),

по 1 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 14,5 мкл mQ. В каждую пробирку вносили по 3 мкл ДНК исследуемого образца. Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наслаивали по 1 капли минерального масла. Пробирки закрывали и центрифугировали 5 с при 3000 об/мин на микроцентрифуге - вортекс. После чего, пробирки переносили в прогретый до 94 °С амплификатор.

На ДНК-амплификаторе запускали следующую программу:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °С	1 мин	1
Денатурация	95 °С	30 сек	30
Отжиг*	51-55°С	40 сек	
Элонгация	72 °С	20сек	
Финальное удлинение	72 °С	2 мин	1
Хранение	10 °С	пауза	-

Каждой паре специфических праймеров соответствует своя температура отжига

Ген	F	R	t опт.
<i>pssA</i>	51.5 °С	50.9 °С	51 °С
<i>pssB</i>	52.9 °С	52.7 °С	53 °С
<i>prsD</i>	50.1 °С	50.0 °С	50 °С
<i>prsE</i>	53.5 °С	54.2 °С	54 °С
<i>rosR</i>	54.3 °С	55.8 °С	55 °С

2.6. Электрофорез

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР осуществляли с использованием стандартных наборов на сертифицированном оборудовании (Биоком, г. Москва) в 1% горизонтальном агарозном геле. Детекцию результатов проводили путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием с последующей визуализацией при освещении УФ на трансиллюминаторе. Документирование результатов проводили с использованием цифровой видеокамеры «Mintron» и программы «Biotest-D» (Биоком, Россия).

Буфер для проведения электрофореза готовили путем добавления к 20 мл 50х-ного трис-ацетатного (ТАЕ) буфера 980 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Для приготовления геля к 1 г агарозы добавляли 2 мл 50х-ного ТАЕ буфера, перемешивали и расплавляли смесь в микроволновой печи в течение 2-3 минут. Периодически помешивая, доводили до кипения до тех пор, пока смесь не становилась прозрачного цвета. Агарозу разливали на ровную поверхность в специальную форму (заливку), соблюдая толщину геля 2 - 5 мм. Затем для просечения лунок в геле устанавливали две пластиковые гребенки. После застывания агарозы (в течение 15-20 минут), гребенки аккуратно извлекали, а гель перемещали в камеру для проведения электрофореза с 2х-ным ТАЕ буфером.

Пробы ДНК с красителем вносили при помощи ручного дозатора по 8 мкл в каждую лунку геля в последовательности, соответствующей нумерации проб. Образцы маркерной лестницы вносили по 1 мкл в отдельную лунку, расположенную вблизи одного из краев пластинки. После внесения образцов в лунки, мы подключаем клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише. Запуск электрофореза производили при помощи источника питания (Эльф-4, ДНК-Технология) при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 100 В. Контроль за электрофоретическим разделением осуществлялся визуально по движению

полосы красителя. Электрофорез проводили 30 минут, затем гель вынимали из формы и помещали в кювету для окрашивания. В кювету с гелем наливали слабый раствор бромистого этидия и окрашивали в течение 5-7 мин. После окрашивания краситель сливали в колбу. Гель промывали под проточной водой и помещали на стекло УФ-трансиллюминатора. Под УФ светом трансиллюминатора проводили анализ, полученных результатов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Проведение анализа последовательностей генов, участвующих в биосинтезе ЭПС

В результате проведенного нами поиска последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD* и *prsE*, участвующих в биосинтезе ЭПС у *R.leguminosarum*, который производился в GenBank, нам удалось получить нуклеотидные последовательности всех исследуемых генов, с помощью базы данных NCBI. Для этого в окошке Search открывали вкладку Nucleotide и вводили в поле название искомого микроорганизма, в нашем случае, *Rhizobium leguminosarum* вместе с интересующим нас геном, и осуществляли поиск. После чего данную нуклеотидную последовательность копировали в буфер обмена и вставляли в окно программы EditSeq пакета Lasergene.

Последовательность гена *pssA*, участвующего в биосинтезе ЭПС у *R.leguminosarum*. Длина гена составляет 764 нуклеотида.

```
gatccttgag catcacgga ctaaacaaca gcatttcgac agagtccttc cggccgagcc
gccgccagca gccgagcctg aagatccaga ccctgttat ccatagcgat gcgccgagc
cgccgttggg ggatctggtc ctgaagcggg cgttcgacat ttttcgtcg ttgagcgccc
tcctcgtcct cgccccgttc cttctgttcg tcgccatgct gatcaagctc gacagccccg
gaccggtgct cttcaagcag acccgctggg gcaagaactg caaggccatc aaggctaca
agttccgttc catgcgacc gacctctgcg acgtctccgg cgttgcccag acggtcaagg
cccgcgcgtc acccgcatcg gcgccatcct gcgccggacg aatgctgatg agttgccgca
gctgctgaac gtgctgctgg gccacatgtc gctcgtcggc ccgcttgcc atgcaatcgg
catgcgcgcc ggccgctgct tctacgaaga gctcgtaccg gaataccatc agcgccatgc
gatgcccc ggcatgacgg gtcttgccc gatgctggc ctgcgcgcc cgaccgatcg
tcccgccaag gcgcgcgccc gcattgccag cgatctctac tacgtcggga atttctcgat
ctggatggac atgcgcatca ttgtcggaac cgtaatgctg gagctgaccg gtggtaaagg
cttctaagct ttaagctttg tgagaagaga ccggtgcct
```

Последовательность гена *pssB*, участвующего в биосинтезе ЭПС у *R.leguminosarum*. Длина гена составляет 798 нуклеотидов.

```
atgctgagga catttgaaaa gccggcactc gaagccggca gggccatcat cacggtcttg
cgcaaggct tccccgtcgc catgaaggcg gatgccagtc cggtcacggc gccgacgag
gaggctgaac gtatcatcct cgctcatctc gccagagatt atccccaaat accgctcgtg
gcggaagaat cggctcggc cggaaggctg cccgacattg ccggccgagg cttctttctt
gtcgaccctc tcgacgggac ccgaggttc gtcgacggac ggcaggaatt caccgtcaac
```

atcgctata tcgagaacgg cgccccggtg gcgggcatcg tctacgcgcc agcgctcgga
 cttgccttct cgggagaacg cggccacgcc gaaagcgtcg tcgtcgcgga cgatttcacg
 gttggcgcac gcagcacaat cactgtgcgc gagcagcctg acgacaggct ggcgcttgca
 agccttcgcc acaacagccc ggagaccgga agcttcctcg ccgaccacgc gatcttcaaa
 tgcaccaata tcggctcctc gctgaaatc tgcctgctgg ccgaacgga ggccgacgtc
 taccgcggtt tcaccgcac gatggaatgg gacaccgcgg ccggcgatgc ggtgctgcgc
 gccgtcggcg gttcgacggt gacgctggac ggaacgccgc tgacctatgg caagacggga
 accgcggccg atttcgactt cgccaaccgg aacttcactt ctggggcggc aggaaacgcg
 tcctcgaacc ggcgtga

Последовательность гена *prsE*, участвующего в биосинтезе ЭПС у
R. leguminosarum. Длина гена составляет 1302 нуклеотида.

tcaactcctga cgaatacgt gctgcatctg atcggtcaga ggcttgggta gataggatat
 aaccgtccgg tcgccgatct tgataaagac ctccgccggc atgccgggat agagctttat
 tgtcttcatc ctggcgatgc tttcaggttt cggcttgacg cgcaggggat agtagcta
 gcccgctgcgc tcatccttga cgatatcagg agcgatagag gtaatctcac cgctcacgtc
 aggcgctcgtg cgttgatcga aagcgctgaa acgcacatcg acggactgac cgacgtgaac
 ctgatcaatg tcgcgggtgg caactttcgc ctcgaccgta agctcgttgt tttcgggcac
 gacgagcatc agcgtctgac cgggatcgat gacgccattg acggtgtgaa cgaagctcg
 tgaactcgtc cggtcagcgg cgcgtgatgt cgagacggtg cagctgatcg agcgcggttc
 cgcgcgctct tcatactcgg ctatctgcgc ctcgacgctg gtcaggctct ttgcgatctc
 cgaacgacga tcctcgtcga gctggatcga ctggcgatcg atctcgattg ccttgccctc
 gcctccgcct ttgctgcaat ttcctggccg ctggtgccct ggagatcggc acgtgccgc
 ttgagctgat tcaaagtga gcgtagaccag ccccttctta tagagcacat caatgcctcc
 aagctcctct tcgatcaagc ccagggaatc attggtggca ttgatctgaa cgaccaacc
 ctttatctgc tcggccagct gatccttacg cgatgccagc tggctcttca tcccgataag
 cgccgacctg cgactgctga acaacttctg ctcgccatcg agaagcttct gcgccgaggt
 gctggatgtc agatcgggtg tgttttcctc gacctcgaac gattcggcgc cgatccgttc
 cgcttttaga cgggcacggc gcgcataaag ctgagcagc gtgctttcga caatcgagag
 gttcgtctcg gtcgctgctc catcgagccg gatcagcacc tgccctgccg tcacatggtc
 gttttcggag accagcaatt ccgacacgat accacctgct aggtgctgga tgttctgaca
 tcgagggctc acgacgatca cgccctcgc gatgactgct ctcgaaagct ctgctcgtcg
 cgccaaccg ccgatgccac aaacgagggc tatcgacaac acaccgaca cggcaacatg
 ccgattgagg gagcgtttcg attcactgat aaccttgctc ac

Последовательность гена *prsD*, участвующего в биосинтезе ЭПС у
R. leguminosarum. Длина гена составляет 1719 нуклеотидов.

ctattcggcc gcattcatgc cgtcgaccac gactttaagc tgagccacgc gctcggcaat
 cggcgtagc gccgcttccg gccggctgac ccttgccaga acttcctctt tgggacaaa
 cgcgatcata cggccttctt gcatcatcag cacgaagtcg cagaccgcca gaacgccgga
 ccgatgtgct atgacaacga caatgccgcc gcgcgcccgc acgctcatga tcgcggcact
 cagcgcggc tcgccttctt catcgagatt ggagttcggg tcgtcgagca cgacgaggaa
 tggttcggcg taaagcgtc ttgccagcgc gatacgtgt ctctggccgg ccgaaagtgc

agcaccgcc ttcgccgatt tcggtttcgt aaccgttcgg tagacgaaga ataagatcgtg
 aacacgcgc cgcgccgct gcggcaacca cgacctcggg tgacatctcc ttcgcgaaacg
 gcagatatt ctgcgcgacg gtccccgaga aaagctccac atcctgcggg agataaccgat
 atgccggcc aagtgcgctc ccgtcccact gatccagcgc agcgccatcg agacgaatgga
 tcctctgac ggtcggccag atgcccataca tcgcccgtgc caacgacgac ttgcccgaggc
 actgtaacc aatgacccca agcgcgctcc ccgcccata gccaagctg acatcggagat
 gaccaagcg ctggcccgcc ggcggtccgc tcgccaagcc ctcgacagtg acttgcttggg
 aggagccgc gagcgcgaag ggggctggaa tctcaggaat ggttttcagc aggctcgaag
 ccgcgcca gctctgctga gcagaaacga aaccacgcca atttccgatc gccgcttcgac
 aggcgccag agcgcgcgag gtcaatatcg agcccgcgat gataattccc gaagaggcctg
 cccttgaat gaccaggatt gcgcccgtcg cgagcgttcc cgattgcaaa gcaatacggaa
 aatcttcga caaggctcga tatccgttgc cgacatccga tgccctgccg gtgatcgtccg
 gtattcact gttcttgccg tcccagattt cggccatcgt gcctgccatg cccatggcgtg
 aataacctc ggagttgcgg atcgaggtct gcgcgaaggc attccgcata ttggcggagtc
 agattgctt ttttgagagc gtacgcgttc cctgattggg catgaacgctc aggatggcggag
 aaccagcga tccaccgatc gcgatataat cgatcgcggg atgaaagagg aagcagatcac
 gatatagaa cggcaaccag ggcagatcga acatcgcgtg cgggcccata ccggacaggaa
 ggttctgat ctggtcgaag tcgcgcaacg gctgaagccc gtcgcccggg attttgacctt
 caacggagc cttgatcagc gcgcggaaca cacgtccggt caccatctcg tcaagcgcacc
 ggcaacacg cacaagcctc ctgcttcgca gaacctcga cgtccttga aaacagtaaag
 cattaacgc agtattgcca ggacagccag cgaaggtatg cttttgctgg ggatgaccgg
 tcatacacc tcaagcataa aaaatgaact tgtaaggtat aggatattga taagcgcgctt
 gctattcca atgaaaacaa gcccccttg catttcctc

Последовательность гена *rosR*, участвующего в биосинтезе ЭПС у *R.leguminosarum*. Длина гена составляет 422 нуклеотида.

atgacggata tagcgaccgg caatgcgccg gagctgcttg tggaactgac agccgacatt
 gtcgcccgtt atgtcagcaa ccatgttgta ccggtcagcg acctggccaa tctgatttcc
 gacgtgcatt cggcactgag caacacgtcc gtaccgcagc ctgctgcggc gatcgtcga
 aagcagaagc ctgcagtttc tgtccgcaag tccgtacagg acgagcagat cacatgtttg
 gaatgcggcg gcaacttcaa gtcccataag cgtcacttga tgacgcatca cagcctctcg
 ccggaagaat accgcgagaa gtgggacctg ccgaccgatt acccgatggg agcgcgccgt
 tatgccgaag cgcgttcgcg cctggcaaaag gagatgggcc tcgggcagcg ccgcaagcgc
 gg

3.2. Подбор специфичных праймеров к исследуемым генам

После нахождения нуклеотидных последовательностей целевых генов, с помощью программы PrimerSelect были установлены длины последовательностей праймеров, температуры их отжига, длины продуктов

реакции, качественное и количественное соотношение нуклеотидов и разница температур плавления каждой пары праймеров.

В итоге, для каждого исследуемого гена были подобраны 5' – 3' последовательности прямого (forward) и обратного (reverse) праймеров, а также оптимальные температуры их отжига (таблица 3).

- 5'-3' последовательности прямого и обратного праймеров для гена *pssA*:

F: AACAGAGTACGATCCTTGAGCAT

R: GACGTAGTAGAGATCGCTGGC

Установленная длина последовательностей праймеров для гена *pssA* представляла собой 23 нуклеотида у прямого праймера и 21 нуклеотид у обратного. Для прямого праймера, выданная программой температура отжига составляла 51.5 °С, а для обратного – 50.9 °С. Исходя из этого, была установлена оптимальная температура отжига для обоих праймеров, которая составляла 51°С. Также была выбрана длина продукта реакции размером в 660 пар нуклеотидов.

- 5'-3' последовательности прямого и обратного праймеров для гена *pssB*:

F: ACAGGAATTCACCGTCAACATC

R: TCCCGTCTTGCCGTAGGT

Установленная длина последовательностей праймеров для гена *pssB* представляла собой 22 нуклеотида у прямого праймера и 18 нуклеотидов у обратного. Для прямого праймера, выданная программой температура отжига составляла 52.9 °С, а для обратного – 52.7 °С. Исходя из этого, была установлена оптимальная температура отжига для обоих праймеров, которая составляла 53°С. Также была выбрана длина продукта реакции размером в 439 пар нуклеотидов.

- 5'-3' последовательности прямого и обратного праймеров для гена *prsD*:

F: TACTTGCGTTGATGCTTTACAC

R: CGACAGTGACTTGCTTGGTAG

Установленная длина последовательностей праймеров для гена *prsD* представляла собой 22 нуклеотида у прямого праймера и 21 нуклеотид у обратного. Для прямого праймера, выданная программой температура отжига составляла 50.1 °С, а для обратного – 50.0 °С. Исходя из этого, была установлена оптимальная температура отжига для обоих праймеров, которая составляла 50°С. Также была выбрана длина продукта реакции размером в 296 пар нуклеотидов.

- 5'-3' последовательности прямого и обратного праймеров для гена *prsD*:

F: TACTTGCGTTGATGCTTTACAC

R: CGACAGTGACTTGCTTGGTAG

Установленная длина последовательностей праймеров для гена *prsD* представляла собой 22 нуклеотида у прямого праймера и 21 нуклеотид у обратного. Для прямого праймера, выданная программой температура отжига составляла 50.1 °С, а для обратного – 50.0 °С. Исходя из этого, была установлена оптимальная температура отжига для обоих праймеров, которая составляла 50°С. Также была выбрана длина продукта реакции размером в 296 пар нуклеотидов.

- 5'-3' последовательности прямого и обратного праймеров для гена *prsE*:

F:GCATGCCGGGATAGAGTTTTA

R:GCTCTACAAGAAGGGGCTCGT

Установленная длина последовательностей праймеров для гена *prsD* представляла собой 21 нуклеотид у прямого праймера и 21 нуклеотид у обратного. Для прямого праймера, выданная программой температура отжига составляла 53.5 °С, а для обратного – 54.2 °С. Исходя из этого, была установлена оптимальная температура отжига для обоих праймеров, которая составляла 54°С. Также была выбрана длина продукта реакции размером в 614 пар нуклеотидов.

Длины продуктов реакции выбирали в диапазоне 200 – 900 пар нуклеотидов.

Таблица 3 - Последовательности праймеров, температуры отжига и размеры ожидаемых продуктов

Объект (GenBank)	Название праймера	5'-3' последовательность (формат nnn- nnn -nnn-...)	Опт. темп. отжига	Ожидаемый размер продукта (п.н.)
<i>Rhizobium leguminosarum pssA</i>	F_Pr1 R_Pr2	F:AACAGAGTACGATCCTTGAGCT R:GACGTAGTAGAGATCGCTGGC	51 °C	660
<i>Rhizobium leguminosarum pssB</i>	F_Pr1 R_Pr2	F:ACAGGAATTCACCGTCAACATC R:TCCCGTCTTGCCGTAGGT	53 °C	439
<i>Rhizobium leguminosarum prsD</i>	F_Pr1 R_Pr2	F:TACTTGCGTTGATGCTTTACAC R:CGACAGTGACTTGCTTGGTAG	50 °C	813
<i>Rhizobium leguminosarum prsE</i>	F_Pr1 R_Pr2	F:GCATGCCGGGATAGAGTTTTA R:GCTCTACAAGAAGGGGCTCGT	54 °C	614

3.3. Выделение ризобиальной ДНК и амплификация исследуемых генов

В результате двухдневной инкубации ризобий в термостате при 28 °C, на среде YM наблюдается рост слизистых колоний белого цвета (рисунок 5). Для культивирования ризобий среда YM была выбрана, поскольку, содержащиеся в ней маннит и дрожжевой экстракт являются источником азотистых питательных веществ, углерода, серы, витаминов и микроэлементов, необходимых для роста бактерий, а соли, служат источниками необходимых ионов и придают буферные свойства питательной среде. Благодаря богатому составу среды YM были получены 99 ризобиальных штаммов, из которых в последующем были выделены ДНК.



Рисунок 5 - Рост бактерий рода *Rhizobium* на среде YM

С помощью ионообменной смолы Chelex, из выросших колоний ризобий было выделено 99 образцов ДНК (таблица 4).

Таблица 4 - Список штаммов *R.leguminosarum*, из которых были выделены ДНК

Растение - хозяин	Выделенные ДНК штаммов
Горошек лесной 7 / <i>Vicia sylvatica</i>	1. г. л. 1
	2. г. л. 2
	3. г. л. 3
	4. г. л. 4
	5. г. л. 5
	6. г. л. 6
	7. г. л. 7
	8. г. л. 8
	9. г. л. 9
	10. г. л. 10
	11. г. л. 12

Горошек заборный 9 / <i>Vicia serium</i>	12.	г.з. 2
	13.	г.з. 3
	14.	г.з. 4
	15.	г.з. 5
	16.	г.з. 7
	17.	г.з. 8
	18.	г.з. 9
	19.	г.з. 10
	20.	г.з. 11
	21.	г.з. 12
	22.	г.з. 17
	23.	г.з. 18
	Чина лесная 1 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	24.
25.		ч. л. 1 2
26.		ч. л. 1 3
27.		ч. л. 1 4
28.		ч. л. 1 5
29.		ч. л. 1 6
30.		ч. л. 1 7
31.		ч. л. 1 8
32.		ч. л. 1 9
33.		ч. л. 1 10
34.		ч. л. 1 11
35.		ч. л. 1 12
Чина лесная 2 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	36.	ч. л. 2 13
	37.	ч. л. 2 14
	38.	ч. л. 2 15
	39.	ч. л. 2 16
	40.	ч. л. 2 17
	41.	ч. л. 2 18
	42.	ч. л. 2 19
	43.	ч. л. 2 20
	44.	ч. л. 2 21
	45.	ч. л. 2 22

	46. ч. л. 2 23
	47. ч. л. 2 24
Чина лесная 3 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	48. ч. л. 3 1
	49. ч. л. 3 3
	50. ч. л. 3 4
	51. ч. л. 3 6
	52. ч. л. 3 7
	53. ч. л. 3 8
	54. ч. л. 3 9
	55. ч. л. 3 11
	56. ч. л. 3 12
	57. ч. л. 3 13
Чина лесная 4 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	58. ч. л. 4 2
	59. ч. л. 4 3
	60. ч. л. 4 4
	61. ч. л. 4 5
	62. ч. л. 4 7
	63. ч. л. 4 8
	64. ч. л. 4 9
	65. ч. л. 4 13
	66. ч. л. 4 14
	67. ч. л. 4 15
Чина Литвинова 3 / <i>Lathyrus litvinovii</i>	68. ч. л. 3 1
	69. ч. л. 3 2
	70. ч. л. 3 3
	71. ч. л. 3 4
	72. ч. л. 3 5
	73. ч. л. 3 6
	74. ч. л. 3 7
	75. ч. л. 3 8
	76. ч. л. 3 9
	77. ч. л. 3 12
Чина гороховидная 4 / <i>Lathyrus pisiformis</i>	78. ч. г. 4 1
	79. ч. г. 4 2

	80.	ч. г. 4 3	
	81.	ч. г. 4 4	
	82.	ч. г. 4 5	
	83.	ч. г. 4 6	
	84.	ч. г. 4 7	
	85.	ч. г. 4 8	
	86.	ч. г. 4 9	
	87.	ч. г. 4 10	
	88.	ч. г. 4 11	
	89.	ч. г. 4 12	
	Чина луговая 5 / <i>Lathyrus pratensis</i>	90.	ч. л. 5 2
		91.	ч. л. 5 3
92.		ч. л. 5 4	
93.		ч. л. 5 5	
94.		ч. л. 5 6	
95.		ч. л. 5 7	
96.		ч. л. 5 9	
97.		ч. л. 5 11	
98.		ч. л. 5 17	
99.		ч. л. 5 17.2	

3.4. Идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* у *R. leguminosarum*

Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *pssA*

В результате амплификации 99 штаммов *R. leguminosarum* на наличие у них гена *pssA*, положительный результат был отмечен у 26 штаммов. Среди которых были 6 штаммов (г.л. 2, 4, 6, 7, 9, 10), выделенных из клубеньков растения Горошка лесного 7, 3 штамма (г.з. 4, 8, 11), выделенных из клубеньков Горошка заборного 9, 1 штамм (ч.л. 2 17), выделенный из клубеньков Чины лесной 2, 2 штамма (ч.л. 3 3, 3 12), выделенных из клубеньков Чины лесной 3, 1 штамм (ч.л. 4 7), выделенный из клубеньков Чины лесной 4, 3 штамма (ч. лит. 3 1, 3 3, 3 7), выделенных из клубеньков Чины Литвиновой 3, 8 штаммов (ч.г. 4 1, 4 2, 4 4, 4 7, 4 8, 4 9, 4 10, 4 11),

выделенных из клубеньков Чины гороховидной 4 и 2 штамма (ч.л. 5 4, 5 5), выделенных из клубеньков Чины луговой 5 (рисунок 6).

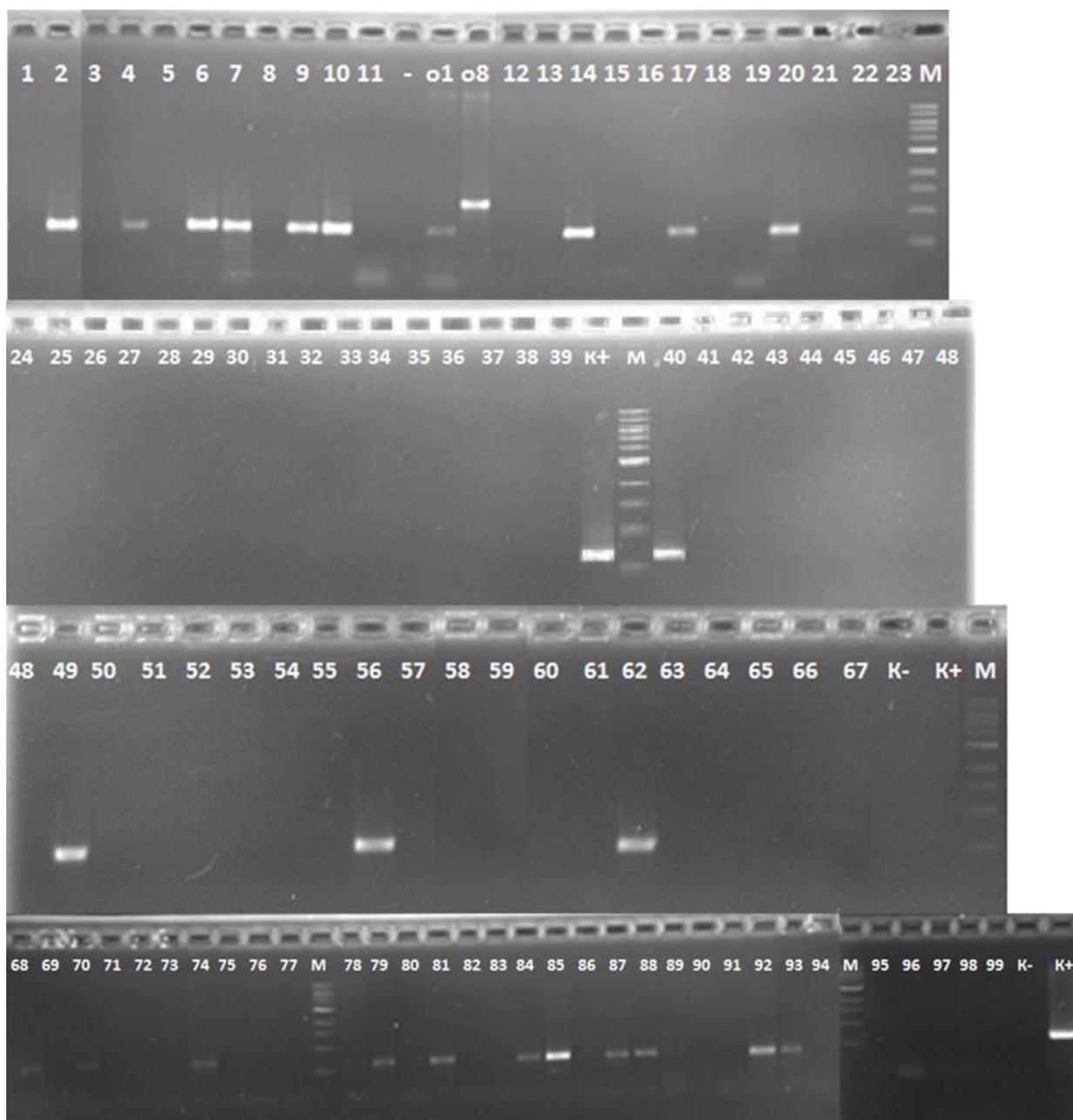


Рисунок 6 - Электрофореграмма амплификации образцов ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *pssA*

1 - 99 штаммы *R. leguminosarum*,

K- - отрицательный контроль

o1 – *R. leguminosarum* VSy12

o8 - *R. leguminosarum* ТНy1

K+,o1,o8 - положительные контроли

М – маркер, п.н.

Размер продукта анализа ПЦР составляет 660 п.н.

Так, положительный результат отмечен только у 26 штаммов, остальные дали отрицательный результат.

Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *pssB*

В результате амплификации 99 штаммов *R. leguminosarum* на наличие у них гена *pssB*, положительный результат был отмечен у 21 штамма. Среди которых были 3 штамма (г.л. 3, 5, 7), выделенных из клубеньков растения Горошка лесного 7, 5 штаммов (г.з. 4, 8, 11, 12, 18), выделенных из клубеньков Горошка заборного 9, 6 штаммов (ч.л. 1 1, 1 2, 1 8, 1 9, 1 10, 1 11), выделенных из клубеньков Чины лесной 1, 3 штамма (ч.л. 2 14, 2 17, 2 21), выделенных из клубеньков Чины лесной 2, 1 штамм (ч.л. 3 11), выделенный из клубеньков Чины лесной 3 и 3 штамма (ч.л. 4 8, 4 9, 4 13), выделенных из клубеньков Чины лесной 4 (рисунок 7).

Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *rosR*

В результате амплификации 99 штаммов *R. leguminosarum* на наличие у них гена *rosR*, положительный результат был отмечен у 32 штаммов. Среди которых были 3 штамма (г.л. 1, 6, 8), выделенных из клубеньков растения Горошка лесного 7, 2 штамма (г.з. 8, 11), выделенных из клубеньков Горошка заборного 9, 3 штамма (ч.л. 1 10, 1 11, 1 12), выделенных из клубеньков Чины лесной 1, 9 штаммов (ч.л. 2 14, 2 15, 2 16, 2 17, 2 18, 2 19, 2 21, 2 22, 2 24), выделенных из клубеньков Чины лесной 2, 3 штамма (ч.л. 3 3, 3 6, 3 9), выделенных из клубеньков Чины лесной 3, 6 штаммов (ч.л. 4 2, 4 5, 4 7, 4 9, 4 13, 4 15), выделенных из клубеньков Чины лесной 4, 2 штамма (ч. лит. 3 2, 3 3), выделенных из клубеньков Чины Литвиновой 3, 2 штамма (ч.г. 4 6, 4 11), выделенных из клубеньков Чины гороховидной 4 и 2 штамма (ч.л. 5 4, 5 5), выделенных из клубеньков Чины луговой 5 (рисунок 8).

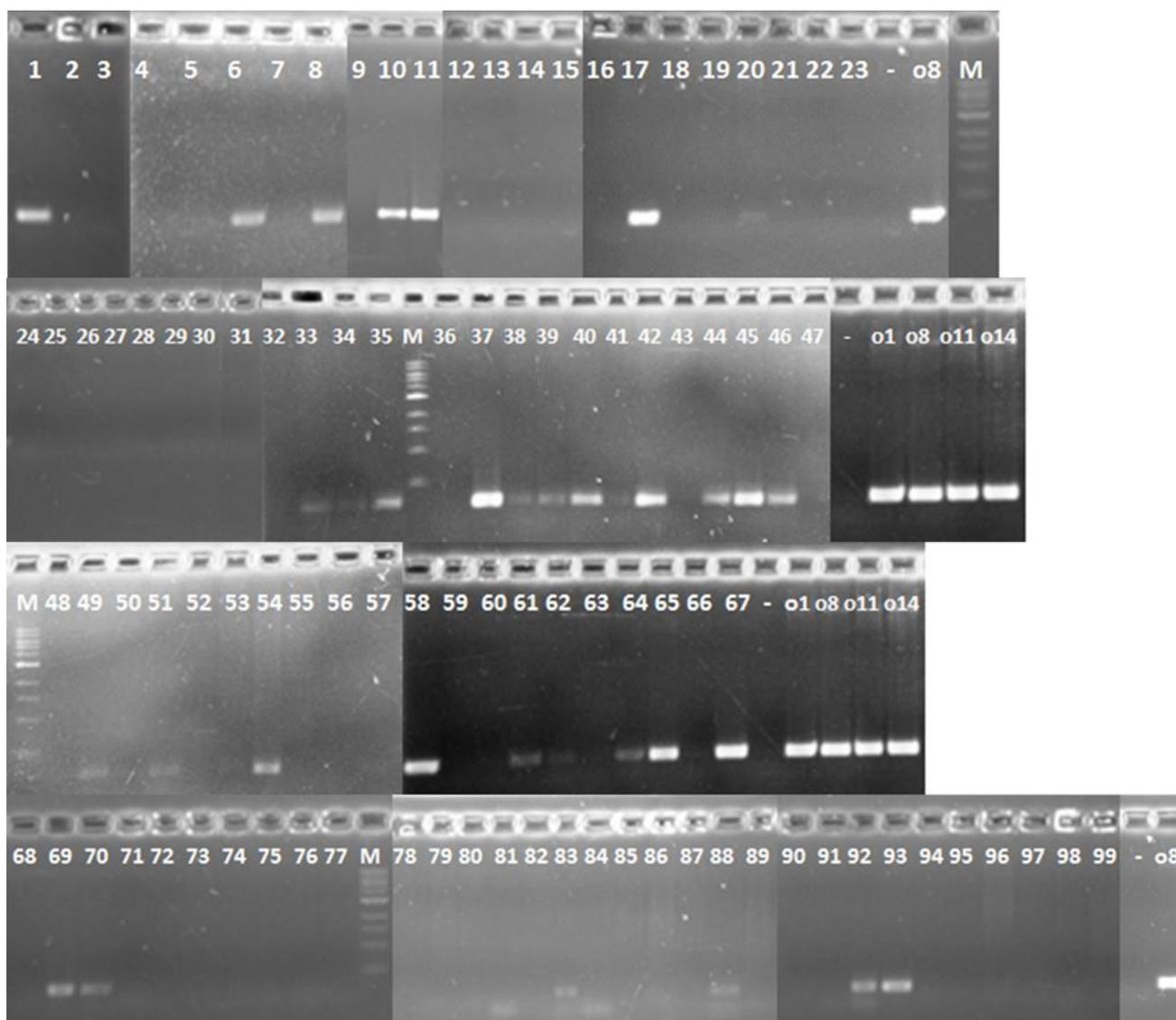


Рисунок 8 - Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *rosR*

1 - 99 штаммы *R. leguminosarum*,

К- - отрицательный контроль

o1 – *R. leguminosarum* VSy12

o8 - *R. leguminosarum* THy1

o11 - *R. leguminosarum* Pvu5

o14 – *R. leguminosarum* TPr3

o1, o8, o11, o14 - положительные контроли

М – маркер, п.н.

Размер продукта анализа ПЦР составляет 296 п.н.

Так, положительный результат отмечен у 34 штаммов *R. leguminosarum*, остальные дали отрицательный результат.

Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *prsD*

В результате амплификации 99 штаммов *R. leguminosarum* на наличие у них гена *prsD*, положительный результат был отмечен у 20 штаммов. Среди которых были 2 штамма (г.л. 4, 10), выделенных из клубеньков растения Горошка лесного 7, 4 штамма (г.з. 2, 5, 7, 8), выделенных из клубеньков Горошка заборного 9, 6 штаммов (ч.л. 3 1, 3 3, 3 6, 3 7, 3 8, 3 9), выделенных из клубеньков Чины лесной 3, 4 штамма (ч.л. 4 2, 4 3, 4 8, 4 14), выделенных из клубеньков Чины лесной 4, 2 штамма (ч. лит. 3 2, 3 6), выделенных из клубеньков Чины Литвиновой 3 и 2 штамма (ч.л. 5 6, 5 11), выделенных из клубеньков Чины луговой 5 (рисунок 9).

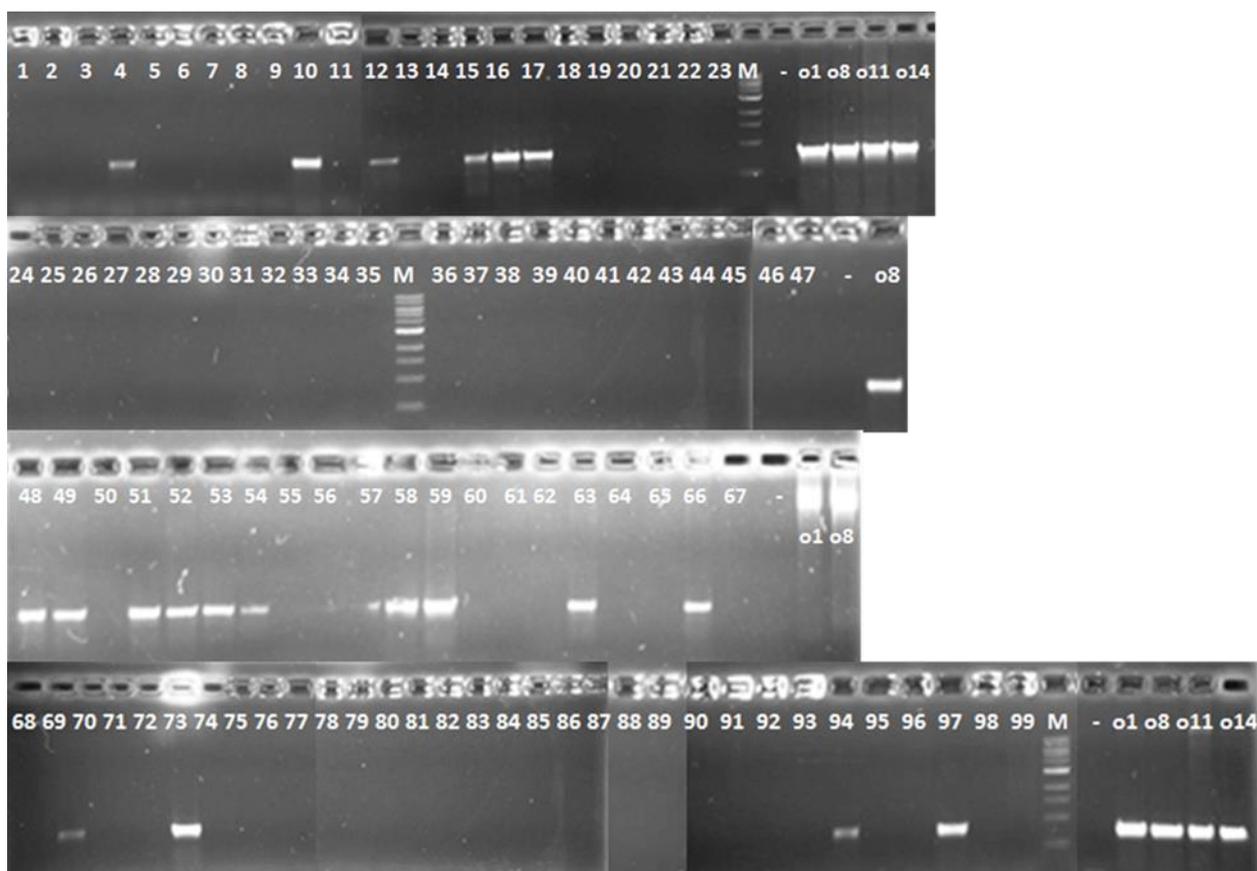


Рисунок 9 - Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *prsD*

1 - 99 штаммы *R. leguminosarum*,

К- - отрицательный контроль

o1 – *R. leguminosarum* VSy12

o8 - *R. leguminosarum* THy1

o11 - *R. leguminosarum* Pvu5

o14 – *R. leguminosarum* TPr3

o1, o8, o11, o14 - положительные контроли

M – маркер, п.н

Размер продукта анализа ПЦР составляет 813 п.н.

Так, положительный результат отмечен у 20 штаммов *R. leguminosarum*, остальные дали отрицательный результат.

Результаты ПЦР анализа с праймерами специфичными к гену *prsE*

В результате амплификации 99 штаммов *R. leguminosarum* на наличие у них гена *prsE*, положительный результат был отмечен у 21 штамма. Среди которых были 9 штаммов (г.з. 3, 5, 7, 8, 9, 11, 17, 18), выделенных из клубеньков Горошка заборного 9, 1 штамм (ч.л. 2 23), выделенный из клубеньков Чины лесной 2 и 10 штаммов (ч.г. 4 1, 4 2, 4 3, 4 4, 4 5, 4 6, 4 7, 4 8, 4 9, 4 11), выделенных из клубеньков Чины гороховидной 4 (рисунок 10).

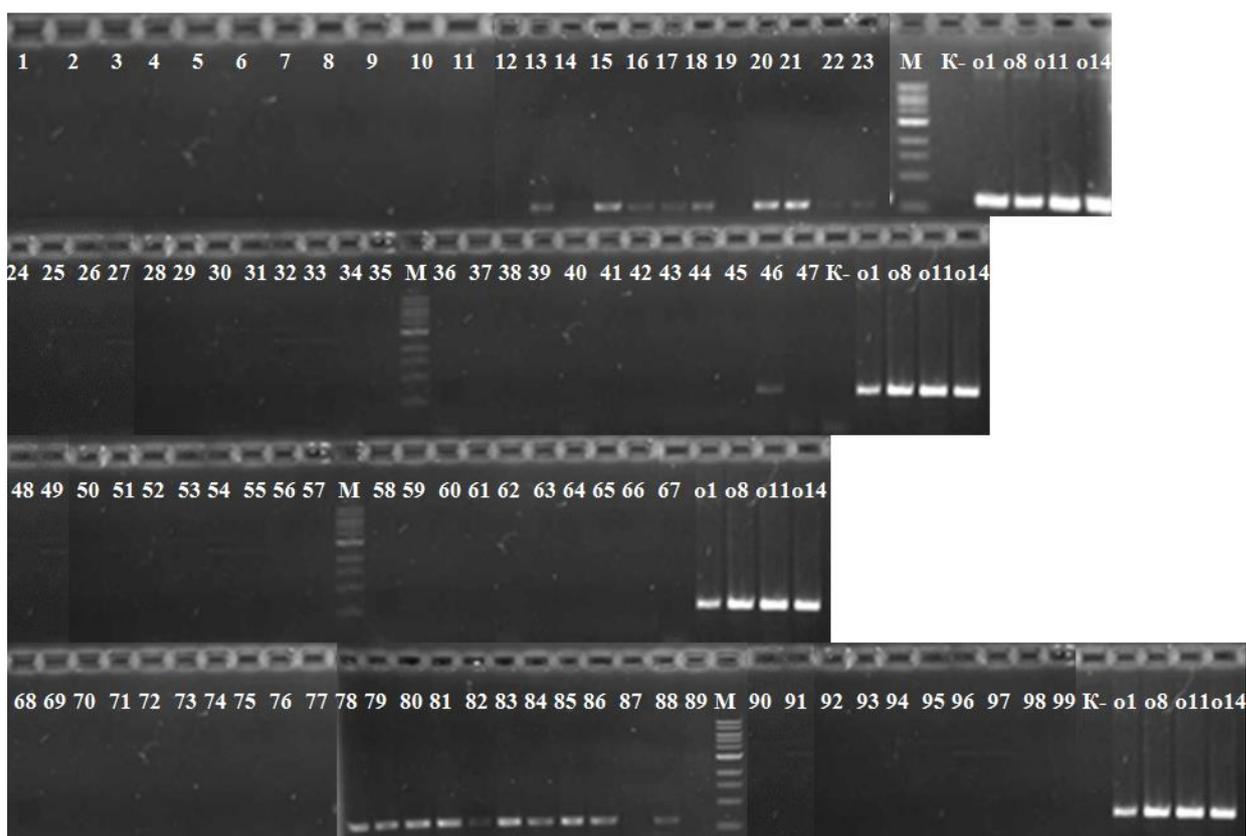


Рисунок 10 - Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *prsE*

1 - 99 штаммы *R. leguminosarum*,

К- - отрицательный контроль

o1 – *R. leguminosarum* VSy12

o8 - *R. leguminosarum* ТНy1

o11 - *R. leguminosarum* Pvu5

o14 – *R. leguminosarum* TPr3

o1, o8, o11, o14 - положительные контроли

М – маркер, п.н

Размер продукта анализа ПЦР составляет 614 п.н.

Так, положительный результат отмечен у 21 штамма *R. leguminosarum*, остальные дали отрицательный результат.

Проведенный скрининг штаммов *R. leguminosarum* на предмет наличия у них генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, показал, что из 99 исследуемых штаммов только 1 штамм имеет все исследуемые гены.

В результате скрининга нами были идентифицированы все исследуемые гены, однако, их наличие в штаммах не всегда было 100% (таблица 5). Оказалось, что в некоторых штаммах гены могут не идентифицироваться. При этом в 23 из них мы не обнаружили ни одного из представленных генов. Такие штаммы характеризуются скудным ослизнением клеток, по сравнению с другими штаммами. У большинства штаммов гены *prsD* и *prsE* не были найдены. Это можно объяснить тем, что они являются вспомогательными генами в процессе синтеза ЭПС, так как основная их роль заключается в секреции белка NodO, который служит для образования каналов в растительной плазматической мембране и играет роль в передаче сигналов в процессе образования клубеньков.

Таблица 5 - Результаты скрининга штаммов *R. leguminosarum*

Растение-хозяин	Кол-во штаммов	<i>pssA</i>	<i>pssB</i>	<i>rosR</i>	<i>prsD</i>	<i>prsE</i>
Горошек заборный 9 / <i>Vicia sepium</i>	12	3	5	2	5	9
Горошек лесной 7 / <i>Vicia sylvatica</i>	11	6	3	3	2	0
Чина лесная 1 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12	0	6	3	0	0
Чина лесная 2 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12	1	3	8	0	1
Чина лесная 3 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10	2	1	3	6	0
Чина лесная 4 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10	1	3	6	4	0
Чина гороховидная 4 / <i>Lathyrus pisiformis</i>	12	7	0	2	0	10
Чина луговая 5 / <i>Lathyrus pratensis</i>	10	2	0	2	2	0
Чина Литвинова 3 / <i>Lathyrus litvinovii</i>	10	3	0	2	2	0

Для наглядного отображения результатов приведена гистограмма (рисунок 11). Она показывает, что больший процент из исследуемых генов составил *rosR*. Это связано с тем, что он играет ключевую роль в регуляции синтеза ЭПС, функционируя как положительный регулятор этого процесса.

На 5 % ниже дал результат гена *pssA*, участвующего в первом этапе синтеза экзополисахарида. Ген *pssB* наравне с геном *prsD* составили 21%. Самый низкий результат в идентификации показал ген *prsE*.

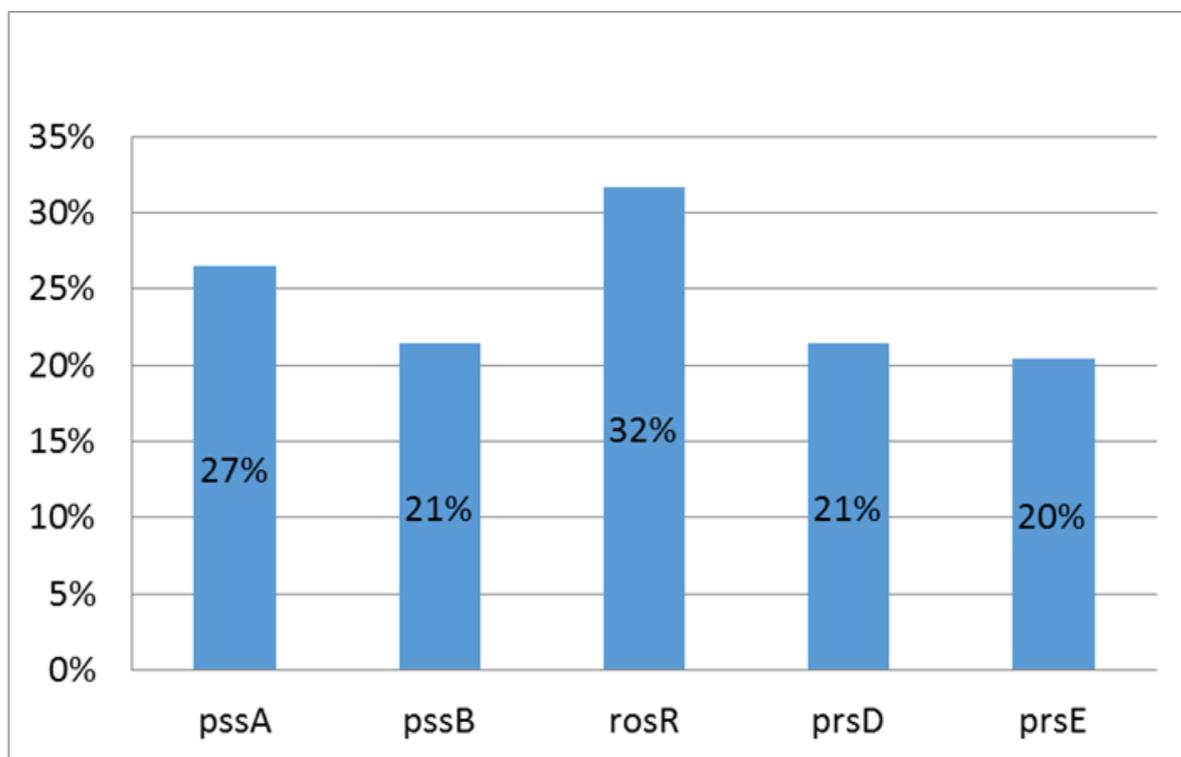


Рисунок 11 - Сравнительная количественная характеристика содержания исследуемых генов в 99 образцах ДНК штаммов *R. leguminosarum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение биопленок в настоящее время вызывает огромный интерес исследователей, главным образом, в связи с тем, что такой способ существования бактерий создает большие проблемы в медицинской практике, поскольку бактериальные клетки, представленные в виде биопленок очень устойчивы к стрессам, включая антибактериальное лечение и дезинфекцию. С биопленочными инфекциями связаны многие хронические заболевания, такие как муковисцидозная пневмония, средний отит, патология зубов и околозубных тканей, остеомиелит, инфекции мочевыводящих путей и другие. Кроме этого, многие из важных заболеваний людей, животных и растений осложняются тем фактом, что бактерии связаны с тканями хозяина или посторонними предметами, такими как катетеры, имплантаты и протезы, образуя биопленки.

В виду этого, в рамках данной работы мы изучали процессы генетического контроля образования биопленок, так как, путем идентификации и изучения бактериальных генов, которые участвуют в формировании биопленок, возможно, разработать лекарства или процедуры для профилактики или лечения инфекций, связанных с биопленками.

В нашем исследовании мы рассмотрели лишь несколько факторов генетической регуляции формирования биопленок и ограничились идентификацией генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, которые участвуют в регуляции биосинтеза ЭПС у бактерий *R.leguminosarum*. Для этого был проведен сравнительный анализ последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, зарегистрированных в GenBank. Также был произведен подбор специфичных праймеров, фланкирующих структурную часть каждого гена для штаммов *R. leguminosarum*. После чего нам удалось провести секвенирование последовательностей ДНК, амплифицированных с помощью подобранных праймеров. Данные полученные при секвенировании исследуемых последовательностей подтвердили их идентичность с

последовательностями, представленными в GenBank. Так, впервые был проведен скрининг 99 штаммов *R. leguminosarum* из коллекции ИБГ УНЦ РАН, в результате которого был выявлен только 1 штамм ризобий, содержащий все исследуемые гены. Ген *pssA* был идентифицирован у 26 ризобиальных штаммов, ген *pssB* - у 21, ген *rosR* - у 31, ген *prsD* - у 20 и ген *prsE* у 21 ризобиального штамма. Большой процент из исследуемых генов составил *rosR*. Это связано с тем, что он играет ключевую роль в регуляции синтеза ЭПС, функционируя как положительный регулятор этого процесса. На 5 % ниже дал результат гена *pssA*, участвующего в первом этапе синтеза ЭПС. Ген *pssB*, кодирующий инозитолмонофосфатазу, наравне с геном *prsD* составили 21%. Самый низкий результат в идентификации показал ген *prsE*. Также было отмечено, что у большинства штаммов гены *prsD* и *prsE* не были найдены. Это можно объяснить тем, что они являются вспомогательными генами в процессе синтеза ЭПС, так как основная их роль заключается в секреции белка NodO, который служит для образования каналов в растительной плазматической мембране и играет роль в передаче сигналов в процессе образования клубеньков.

Таким образом, проведенное исследование показывает оценку важности генетического контроля биосинтеза ЭПС в процессе образования ризобиальных биопленок. Поскольку, регуляция биосинтеза ЭПС очень важна для установления симбиотических отношений с бобовыми растениями, а также для питания, защиты от вредных факторов окружающей среды и формирования биопленок. Чем больше ризобии синтезируют ЭПС, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами.

Кроме этого, касаясь проблем образования биопленок в медицинской практике, методы идентификации и изучение генов, которые участвуют в образовании патогенных биопленок в организме человека, позволяют бороться с биопленками, путём регулирования этих генов, что может привести к тому, что бактерии окажутся неспособны к образованию биопленок.

В последние годы число бактерий с множественной лекарственной устойчивостью быстро возросло, и в разных регионах мира выявлено несколько эпидемий. Столкнувшись с такой ситуацией, которая представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения, разработка и использование новых и быстрых технологий имеет решающее значение.

ВЫВОДЫ

1. Проведен сравнительный анализ последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, зарегистрированных в GenBank.
2. Произведен подбор специфичных праймеров к генам *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий *Rhizobium leguminosarum*.
3. С помощью ионообменной смолы Chelex были выделены ДНК из 99 штаммов *R. leguminosarum*.
4. Методом полимеразной цепной реакции были амплифицированы гены *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*.
5. Проведено секвенирование, полученных при амплификации генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, последовательностей ДНК и их сравнение с последовательностями, представленными в GenBank.
6. Проведен скрининг штаммов *Rhizobium leguminosarum* на наличие генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*. В результате проведенного скрининга из 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* был выявлен лишь 1 штамм ризобий, содержащий все исследуемые гены. Ген *pssA* был идентифицирован у 26 ризобиальных штаммов, ген *pssB* - у 21, ген *rosR* - у 31, ген *prsD* - у 20 и ген *prsE* у 21 ризобиального штамма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афиногенова, А.Г. Микробные биоплёнки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. 2011. № 3.– С. 119–125.
2. 3. Белобородова Н.В., Байрамов И.Т. Микробные биопленки // Пятая ежегодная московская конференция «Гнойно-септические заболевания у детей» с участием регионов России и стран СНГ: Сборник докладов. 2009. С. 7–39
3. Глушанова, Н.А. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Медицина в Кузбасе. 2015. № 2. С. 30 – 35.
4. Доброхотский, О.Н. Эпидемиологическое значение биоплёнок в технических системах /О.Н. Доброхотский, Ю.Н. Хомяков, Т.И. Хомякова // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2008. № 4.– С. 78–80.
5. Жуков В.А., Рычагова Т.С., Штарк О.Ю., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями. Экологическая генетика. 2008, том 6. С. 14-19.
6. Овцына А.О., Тихонович И.А. Структура, функции и возможность практического применения сигнальных молекул, инициирующих развитие бобово-ризобиального симбиоза. Экологическая генетика. 2004. Том 2. С. 14-24.
7. Стрелкова, Е.А. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды / Е.А. Стрелкова, Н.В. Позднякова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, С.С. Беляев // Микробиология. 2013. Т. 82. – №2. – С. 131-138.
8. Тец, Г.В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биоплёнок с антибиотиками (экспериментальное

исследование): автореф. дис. канд. мед. наук / Г.В. Тец.– Санкт-Петербург, 2007.– 23 с.

9. Цыганова А. В., Цыганов В. Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями. Успехи современной биологии, 2012, том 132, № 2, с. 211-222

10. Честнова, Т.В. Современные представления о физико-химических особенностях существования бактерий в составе биоплёнок. / Т.В. Честнова, Н.В. Серёгина // Общественное здоровье и здравоохранение: профилактическая и клиническая медицина // XXXXV научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава ТулГУ / ТулГУ, 2009. С. 138.

11. Честнова, Т.В. Современные представления о физико-химических особенностях существования бактерий в составе биоплёнок. / Т.В. Честнова, Н.В. Серёгина // Общественное здоровье и здравоохранение: профилактическая и клиническая медицина // XXXXV научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава ТулГУ / ТулГУ, 2009. С. 138.

12. Ausmees, N.; Jacobsson, K.; Lindberg, M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. Microbiology 2001, 147, 549–559.

13. Bandara HMHN, Lam OLT, Jin LJ, et al. Microbial chemical signaling: a current perspective. 2012. Crit Rev Microbiol 38: 217–249.

14. Chen, H.; Gao, K.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A.; Rolfe, B.G. Functional genomic analysis of global regulator NolR in *Sinorhizobium meliloti*. Mol. Plant Microbe Interact. 2005, 18, 1340–1352.

15. Dowd, S. E., Wolcott, R. D and Zischakau Y. A. Bacterial diversity in surgical siteinfections: not just aerobic cocci any more. Journal of Wound Care, 2009, vol. 18, no. 8, pp. 317–323..

16. Downie, J.A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010, 34, 150–170.
17. Ealand C., Rimal B., Chang J., Mashigo L., Chengalroyen M., Mapela L., Beukes G., Machowski E., Sung Joon Kim., Kana B. Resuscitation promoting factors are required for biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018.
18. Edwards, A.; Frederix, M.; Wisniewski-Dyé, F.; Jones, J.; Zorreguieta, A.; Downie, J.A. The cin and rai quorum-sensing regulatory systems in *Rhizobium leguminosarum* are coordinated by ExpR and CinS, a small regulatory protein coexpressed with CinI. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 3059–3067.
19. Finan, T.M.; Weidner, S.; Womg, K.; Buhrmester, J.; Chain, P.; Vorhölter, F.J.; Hernandez-Lucas, I.; Becker, A.; Cowie, A.; Gouzy, J.; et al. The complete sequence of the 1683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 9889–9894.
20. Fraysse, N.; Couderc, F.; Poinso, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, 1365–1380.
21. González, V.; Santamaría, R.I.; Bustos, P.; Hernández-González, I.; Medrano-Soto, A.; Moreno-Hagelsieb, G.; Janga, S.C.; Ramírez, M.A.; Jiménez-Jacinto, V.; Collado-Vides, J.; et al. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 3834–3839.
22. Islam, S.T.; Eckford, P.D.; Jones, M.L.; Nugent, T.; Bear, C.E.; Vogel, C.; Lam, J.S. Proton-dependent gating and proton uptake by Wzx support O-antigen-subunit antiport across the bacterial inner membrane. *MBio* 2013, 4, e00678-13.
23. Ivashina, T.V.; Fedorova, E.E.; Ashina, N.P.; Kalinchuk, N.A.; Druzhinina, T.N.; Shashkov, A.S.; Shibaev, V.N.; Ksenzenko, V.N. Mutation in

the *pssM* gene encoding ketal pyruvate transferase leads to disruption of *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* - *Pisum sativum* symbiosis. J. Appl. Microbiol. 2010, 109, 731–742.

24. Janczarek M., Rachwał K., Cieśla J., Ginalska G., Bieganowski A. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. Plant and Soil. 2014, 388, 211–227.

25. Janczarek, M. Environmental Signals and Regulatory Pathways That Influence Exopolysaccharide Production in *Rhizobia*. Molecular Sciences. 2011, 7899-7933.

26. Janczarek, M. University of M. Curie-Skłodowska, Lublin, Poland. Personal communication, 2011.

27. Janczarek, M.; Jaroszek-Ścisiel, J.; Skorupska, A. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. Antonie Van Leeuwenhoek 2009, 96, 471–486.

28. Janczarek, M.; Kalita, M.; Skorupska, A. New taxonomic markers for identification of *Rhizobium leguminosarum* and discrimination between closely related species. Arch. Microbiol. 2009, 191, 207–219.

29. Janczarek, M.; Kutkowska, J.; Piersiak, T.; Skorupska, A. *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. BMC Microbiol. 2010, 10, doi:10.1186/1471-2180-10-284.

30. Janczarek, M.; Rachwał, K.; Turska-Szewczuk, A. A mutation in *pssE* affects exopolysaccharide synthesis by *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*, its surface properties, and symbiosis with clover. Plant Soil. 2017, 417, 331–347.

31. Janczarek, M.; Skorupska, A. Exopolysaccharide synthesis in *R. leguminosarum* *bv. trifolii* is related to various metabolic pathway. Res. Microbiol. 2003, 154, 433–442.

32. Janczarek, M.; Skorupska, A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4132–4155.
33. Janczarek, M.; Skorupska, A. Regulation of *pssA* and *pssB* gene expression in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* in response to environmental factors. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004, 85, 217–227.
34. Janczarek, M.; Skorupska, A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* gene expression is regulated by catabolic repression. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 291, 112–119.
35. Janczarek, M.; Skorupska, A. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: Transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, 20, 867–881.
36. Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Minamisawa, K.; Uchiumi, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Idesawa, K.; Iriguchi, M.; Kawashima, K.; et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 2002, 9, 225–256.
37. Krehenbrink, M.; Downie, J.A. Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC Genomics* 2008, 9, doi:10.1186/1471-2164-9-55.
38. Król, J.E.; Mazur, A.; Marczak, M.; Skorupska, A. Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics* 2007, 89, 237–247.
39. Ksenzenko, V.N.; Ivashina, T.V.; Dubeïkovskaia, Z.A.; Ivanov, S.G.; Nanazashvili, M.B.; Druzhinina, T.N.; Kalinchuk, N.A.; Shibaev, V.N. The *pssA* gene encodes UDP-glucose: Polyprenyl phosphate-glucosyl phosphotransferase initiating biosynthesis of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2007, 33, 150–155.
40. Kutkowska, J.; Janczarek, M.; Kopcińska, J.; Urbanik-Sypniewska, T.; Skorupska, A. Effects of *pssB* mutation on surface polysaccharides and

symbiotic phenotype of *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii*. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 2007, 49, 81–89.

41. Kutkowska, J.; Turska-Szewczuk, A.; Janczarek, M.; Paduch, R.; Kaminska, T.; Urbanik-Sypniewska, T. Biological activity of (lipo)polysaccharides of the exopolysaccharide-deficient mutant Rt120 derived from *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii* strain TA1. Biochemistry (Mosc.) 2011, 76, 840–850.

42. Laus, M.C.; Logman, T.J.; Lamers, G.E.; van Brussel, A.A.; Carlson, R.W.; Kijne, J.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. Mol. Microbiol. 2006, 59, 1704–1713.

43. Laus, M.C.; Logman, T.J.; van Brussel, A.A.N.; Carlson, R.W.; Azadi, P.; Gao, M.; Kijne, J.W. Involvement of *exo5* in production of surface polysaccharides in *Rhizobium leguminosarum* and its role in nodulation of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. J. Bacteriol. 2004, 186, 6617–6625.

44. Laus, M.C.; van Brussel, A.A.; Kijne, J.W. Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. Mol. Plant Microbe Interact. 2005, 18, 1123–1129.

45. Lewis, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival /K. Lewis Biochemistry. 2005. № 54.– P. 49–79.

46. Long SR. Genes and signals in the *Rhizobium* -legume symbiosis. Plant Physiol. 2001; 125:69–72. doi: 10.1104/pp.125.1.69.

47. Lu Y, Su C, Unoje O, et al. Quorum sensing controls hyphal initiation in *Candida albicans* through Ubr1-mediated protein degradation. 2014. P Natl Acad Sci U S A 111:1975–1980.

48. Marczak M., Mazur A., Koper P., Zebracki K. and Skorupska. A. Synthesis of Rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. Genes. 2017. 8, 360.

49. Marczak, M.; Mazur, A.; Gruszecki, W.I.; Skorupska, A. PssO, a unique extracellular protein important for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii*. Biochimie 2008, 90, 1781–1790.

50. Marczak, M.; Mazur, A.; Król, J.E.; Gruszecki, W.I.; Skorupska, A. Lipoprotein PssN of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: Subcellular localization and possible involvement in exopolysaccharide export. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 6943–6952.
51. Marolda, C.L.; Tatar, L.D.; Alaimo, C.; Aebi, M.; Valvano, M.A. Interplay of the Wzx translocase and the corresponding polymerase and chain length regulator proteins in the translocation and periplasmic assembly of lipopolysaccharide O-antigen. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 5124–5135.
52. Mazur, A.; Król, J.E.; Marczak, M.; Skorupska, A. Membrane topology of PssT, the transmembrane protein component of type I exopolysaccharide transport system in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 2503–2511.
53. Mazur, A.; Król, J.E.; Wielbo, J.; Urbanik-Sypniewska, T.; Skorupska, A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* PssP protein is required for exopolysaccharide biosynthesis and polymerization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2002, 15, 388–397.
54. Mazur, A.; Marczak, M.; Król, J.; Skorupska, A. Topological and transcriptional analysis of pssL gene product: A putative Wzx-like exopolysaccharide translocase in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1. *Arch. Microbiol.* 2005, 184, 1–10.
55. Muszyński, A.; Laus, M.; Kijne, J.W.; Carlson, R.W. The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* RBL5523 and its UDP-glucose dehydrogenase mutant (*exo5*). *Glycobiology* 2011, 21, 55–68.
56. Quelas, J.I.; López-García, S.L.; Casabuono, A.; Althabegoiti, M.J.; Mongiardini, E.J.; Pérez-Giménez, J.; Couto, A.; Lodeiro, A.R. Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Arch. Microbiol.* 2006, 186, 119–128.
57. Reeve, W.; O'Hara, G.; Chain, P.; Ardley, J.; Bräu, L.; Nandesena, K.; Tiwari, R.; Copeland, A.; Nolan, M.; Han, C.; et al. Complete genome

sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. *Stand. Genomic Sci.* 2010, 2, 347–356.

58. Reeve, W.; O'Hara, G.; Chain, P.; Ardley, J.; Bräu, L.; Nandesena, K.; Tiwari, R.; Malfatti, S.; Kiss, H.; Lapidus, A.; et al. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. *Stand. Genomic Sci.* 2010, 2, 66–76.

59. Russo DM, Williams A, Edwards A, Posadas DM, Finnie C, Dankert M, Downie JA, Zorreguieta A. Proteins exported via the PrsD–PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol.* 2006, 188:4474–4486

60. Skorupska, A.; Janczarek, M.; Marczak, M.; Mazur, A.; Król, J. Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* 2006, 5, doi: 10.1186/1475-2859-5-7.

61. Vinardell, J.M.; Ollero, F.J.; Hidalgo, A.; López-Baena, F.J.; Medina, C.; Ivanov-Vangelov, K.; Parada, M.; Madinabeitia, N.; Espuny Mdel, R.; Bellogín, R.A.; et al. NolR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2004, 17, 676–685.

62. Whitfield, C.; Paiment, A. Biosynthesis and assembly of Group I capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr. Res.* 2003, 338, 2491–2502.

63. Wielbo, J.; Mazur, A.; Krol, J.E.; Marczak, M.; Skorupska, A. Environmental modulation of the pssTNOP gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 2004, 50, 1–11.

64. Wielbo, J.; Skorupska, A. Influence of phosphate and ammonia on the growth, exopolysaccharide production and symbiosis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 with clover (*Trifolium pratense*). *Acta Biol. Hung.* 2008, 59, 115–127.

65. Williams HE, Steele JC, Clements MO, et al. gamma-Heptalactone is an endogenously produced quorum-sensing molecule regulating growth and secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans*. 2012. *App Microbiol Biotech* 96:773–781.

66. Woodward, R.; Yi,W.; Li, L.; Zhao, G.; Eguchi, H.; Sridhar, P.R.; Guo, H.; Song, J.K.; Motari, E.; Cai, L.; et al. In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: Defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 418–423.

67. Wuster A, Babu MM. Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. 2010. *Mol Biosyst* 6: 134–141.

68. Young, J.P.W.; Crossman, L.C.; Johnston, A.W.B.; Thomson, N.R.; Ghazoui, Z.F.; Hull, K.H.; Wexler, M.; Curson, A.R.; Todd, J.D.; Poole, P.S.; et al. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* 2006, 7, doi:10.1186/gb-2006-7-4-r34.

ПРИЛОЖЕНИЕ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

Е. Э. Аксакова, Т. С. Аздерханова, А. М. Савина

В НОМИНАЦИИ

Микробиология растений

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *А. И. Байлишев*

83-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ
МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

СЕРТИФИКАТ

УЧАСТНИКА (ЦЫ) Аздерхановат Т.С., Акеновлат Е.Э., Сабитов А.М.
 НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ г.Б.М., профессор Байматов А.Х.

83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых
 с международным участием

«Вопросы теоретической и практической медицины»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов



Сертификат

АЗДЕРХАНОВА Гюзель САЛАВАТОВНА

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2018 High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа
в рамках Государственного контракта РНФ "Новый рациональный
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич





Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

vestnikbgmu.ru

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТочНОЙ МЕМБРАНЫ К ИНСУЛИНУ ПРИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ	1164
У.И. Субхангулов, Т.И. Мальцева	
ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ	1169
Н.О.Камалетдинова	
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ	1173
Р.К. Динова, А.В. Цветкова, К.В. Хлопова, О.В. Буйлова	
ВЫДЕЛЕНИЕ АУТОШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ	1178
А. Р. Аюпова	
ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АССОЦИАЦИИ I/D ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА АНГИОТЕНЗИН ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ И ТОЛЕРАНТНОСТИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ У СТУДЕНТОВ.....	1183
Г.С. Аздерханова, Е.Э. Аксюкова, А.М. Лавина	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА <i>RHIZOBIUM</i>	1188
Э.М.Муратов, Ю.Л. Баймурзина	
АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПРОДУКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ	1193
Э. И. МУХАМЕТЗЯНОВА, Е. Р. ЯКУПОВА	
ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ <i>STARNYLOCOCCUSAUREUS</i>	1197
Е. Э. Аксюкова, Г. С. Аздерханова, А. М. Лавина	
МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА <i>RHIZOBIUM</i>	1201
Э. Р. Ганиева, А.А. Измайлова	
БИОИНДИКАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА СЕЛА АСКИНО ПО СОСТОЯНИЮ <i>PINUS SYLVESTRIS L.</i>	1206
Общественное здоровье и здравоохранение, история медицины	
Р. Р. Даутов	
МЕДИКО – СОЦИАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ТРАВМАМИ	1213
А. С. Абдуллина, Г. И. Гарифуллина, Р. К. Фазлинуров, Н. Ф. Тимерханова	
АНАЛИЗ ИНФОРМИРОВАННОСТИ НАСЕЛЕНИЯ О ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА, УРОВНЯ ОБРАЗОВАНИЯ И МЕСТА ПРОЖИВАНИЯ	1218

УДК 579.262

Г.С. Аздерханова, Е.Э. Аксюкова, А.М. Лавина
**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ
 ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM***

Научный руководитель - д.б.н., профессор Баймиев Ал.Х.

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского
 Государственного Медицинского Университета, г. Уфа
 Институт биохимии и генетики, УФИЦ РАН, г. Уфа

Резюме. Для исследования было выбрано 5 генов, участвующих в биосинтезе ризобийных экзополисахаридов (*pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*). Проведен скрининг 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* (изолированных из клубеньков 6 видов дикорастущих бобовых растений) из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН на предмет наличия у них генов, регулирующих биосинтез ЭПС. Показано, что из 99 исследуемых штаммов только 1 штамм имеет все исследуемые гены. Ген *pssA* был идентифицирован у 26, ген *pssB* - у 21, ген *rosR* - у 31, ген *prsD* - у 21 и ген *prsE* - у 20 ризобийных штаммов.

Ключевые слова: экзополисахариды (ЭПС), *Rhizobium leguminosarum*, ризобии, биопленка.

G. S. Azderhanova, E. E. Aksyukova, A. M. Lavina

**IDENTIFICATION OF GENES REGULATING THE BIOSYNTHESIS OF
 EXZOPOLYSACCHARIDES IN BACTERIA OF THE GENUS *RHIZOBIUM***

Scientific Advisor – Ph. D. in Biological, Full professor Al. H. Baimiev

Department of Fundamental and Applied Microbiology of the Bashkir State Medical
 University, Ufa
 Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of the Russian Academy of
 Sciences, Ufa

Summary. Five genes involved in the biosynthesis of rhizobial exopolysaccharides (*pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* and *rosR*) were chosen for the study. Screened 99 strains of *Rhizobium leguminosarum* (out of nodules of 6 species of wild leguminous plants) from the collection of microorganisms IBG UFIC RAS for the presence of their genes regulating the biosynthesis of EPS. It is shown that of the 99 strains studied, only one strain has all the investigated genes. *PssA* gene was identified in 26, *pssB* gene in 21, *rosR*-31 gene, *prsD* gene in 21 and *prsE* gene in 20 rhizobial strains.

Key words: exopolysaccharides (EPS), *Rhizobium leguminosarum*, rhizobia, biofilm.

Актуальность. В род *Rhizobium* объединены почвенные бактерии, вызывающие образование специальных структур (клубеньков) на корнях бобовых растений. Внутри этих

узелков, в условиях симбиоза ризобии способны фиксировать азот, путем восстановления атмосферного азота до аммиака ферментативным комплексом - нитрогеназой [1].

Первоначальным этапом в формировании симбиотических отношений является прикрепление ризобий к поверхности корней растения-хозяина, путем обратимого и неспецифического связывания. Такое прикрепление представляет собой начальный этап формирования ризобиями биопленок на корнях растений. Наиболее важная роль в данном процессе принадлежит кислым внеклеточным полисахаридам или экзополисахаридам (ЭПС), синтезируемые азотфиксирующими бактериями [2].

Ризобияльные ЭПС представляют собой видоспецифические гетерополисахаридные полимеры, состоящие из простых сахаров, которые декорированы неуглеводными заместителями [3]. Синтезируемые ризобактериями ЭПС играют решающую роль в симбиотических взаимодействиях клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Также они необходимы для роста и развития инфекционных нитей, представляющие собой специфичные трубчатые структуры, через которые бактерии проникают в клетки корня растения-хозяина [4]. В клетках свободноживущих ризобий ЭПС выполняют ряд других функций, таких как сбор питательных веществ, защита от экологических нагрузок, прикрепление к абиотическим и биотическим поверхностям и формирование биопленок, обеспечивающих адаптацию этих бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды [1].

Синтез повторяющихся звеньев ЭПС, их модификация, полимеризация и экспорт на клеточную поверхность контролируется генами, названных *exo* / *exs*, *exr* или *pss*, которые локализованы на ризобияльных мегаплазмидах или хромосоме. Функция этих генов была идентифицирована путем выделения и характеристики нескольких мутантов, которые были отключены при синтезе ЭПС [3]. В данном исследовании мы остановимся лишь на 5 генах, регулирующих биосинтез ЭПС (*pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*). Большинство *pss* – генов, участвующих в биосинтезе ЭПС у *R. leguminosarum* организованы в виде оперона. Исключение составляет ген *pssA*, который локализован на удаленном расстоянии от указанного кластера и представляет собой моноцистронный оперон [5].

Ген *pssA* кодирует интегральный белок внутренней мембраны UDP-глюкозу: полипренил-фосфатную глюкозофосфотрансферазу, которая участвует в первом этапе синтеза ЭПС. Ген *pssA* выполняет важную роль в биосинтезе ЭПС. Мутанты по гену *pssA* не способны продуцировать ЭПС и, как следствие, нарушают нормальное развитие азотфиксирующих клубеньков на корнях бобовых растений и образование биопленок как *in vitro*, так и на корневых волосках [5].

После гена *pssA* локализуется ген *pssB*, кодирующий инозитолмонофосфатазу. Катаболизм инозита важен для выживания и конкуренции ризобияльных штаммов, что имеет решающее значение для успешного вторжения в клетки корня растения-хозяина [7]. Мутанты по гену *pssB* синтезируют большое количество ЭПС и индуцируют клубеньки с бактериоидами, которые не фиксируют азот. Дополнительные копии *pssB* в штамме дикого типа снижают уровень производства ЭПС. Это указывает на то, что *pssB* может играть роль в отрицательной регуляции синтеза ЭПС в *R. leguminosarum* [3].

Следующим, из рассмотренных нами регуляторных генов является *rosR*, который кодирует транскрипционный регулятор, участвующий в биосинтезе ЭПС. Мутация в гене *rosR* в *R. leguminosarum* приводит к 3-кратному уменьшению синтеза ЭПС и образованию у клевера клубеньков, которые не способны фиксировать атмосферный азот, тогда как множественные копии этого гена вызывают 2-кратное увеличение синтеза этого полимера. Это говорит о том, что ген *rosR* является положительным регулятором процесса синтеза ЭПС. На экспрессию *rosR* влияют такие факторы окружающей среды, как источники углерода, фосфатов и флавоноиды [6].

Были также признаны несколько других генов, важных для синтеза ЭПС, но не обязательно непосредственно участвующих в этом процессе. Так, например, гены *prsD* и *prsE* кодируют два компонента системы секреции белка I типа, которые необходимы для секреции белка NodO и внеклеточных белков с активной деградацией полисахаридов у *R. leguminosarum*. NodO представляет собой Ca^{2+} -связывающий белок, который служит для образования каналов в растительной плазматической мембране и играет роль в передаче сигналов в процессе клубенькообразования. Мутация генов *prsD* и *prsE* приводит к ухудшению синтеза ЭПС [3].

Накопленные данные подтверждают важность генетического контроля синтеза экзополисахаридов и изучения их биологических функций в симбиотических взаимодействиях между ризобиями и растением-хозяином.

Цель. Идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий *Rhizobium leguminosarum*

Материалы и методы. Материалом для исследования генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* послужили 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (штаммы были изолированы из клубеньков 6 видов дикорастущих бобовых растений, после чего их ДНК были выделены с использованием ионообменной смолы Chelex).

Аmplификация исследуемых генов проводилась методом полимеразной цепной реакции в амплификаторе МС-2 «Терцик». В состав реакционной смеси для ПЦР входили:

выделенная ДНК, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза), буфер и пара подобранных специфических праймеров. Подбор праймеров производился на основе базы данных NCBI в GenBank. Выбор праймеров проводили с помощью программы Primer Select

После ПЦР-исследования для идентификации продуктов амплификации был проведен горизонтальный электрофорез в агарозном геле. Затем гель окрашивался бромистым этидием для последующей визуализации результатов в проходящем УФ-свете трансиллюминатора.

Результаты и обсуждения. Проведенный скрининг штаммов *R. leguminosarum* на предмет наличия у них генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов показал, что из 99 исследуемых штаммов только 1 штамм имеет все исследуемые гены. Кроме этого, в ходе исследования было выяснено, что: ген *pssA* был идентифицирован у 26 ризобияльных штаммов, ген *pssB* был идентифицирован у 21 ризобияльного штамма, ген *rosR* был идентифицирован у 31 ризобияльного штамма, ген *prsD* был идентифицирован у 21 ризобияльного штамма и ген *prsE* был идентифицирован у 20 ризобияльных штаммов.

Растение-хозяин	Количество штаммов	<i>pssA</i>	<i>pssB</i>	<i>rosR</i>	<i>prsD</i>	<i>prsE</i>
горошек заборный 9	12	3	5	2	5	9
горошек лесной 7	11	6	3	3	2	0
чина лесная 1	12	0	6	3	0	0
чина лесная 2	12	1	3	8	0	1
чина лесная 3	10	2	1	3	6	0
чина лесная 4	10	1	3	6	4	0
чина гороховидная 4	12	7	0	2	0	10
чина луговая 5	10	3	0	2	2	0
чина Литвинова 3	10	3	0	2	2	0

Рис. 1. Скрининг штаммов *R. leguminosarum* на предмет наличия у них генов регулирующих биосинтез экзополисахаридов

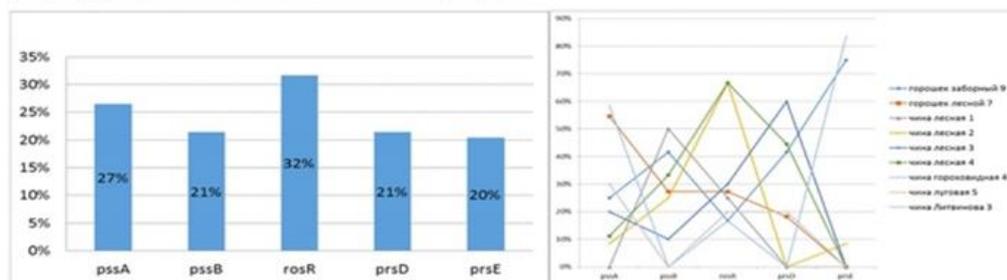


Рис. 2. Идентифицированные в штаммах *R. leguminosarum* гены экзополисахаридов

В результате скрининга штаммов ризобактерий нами были идентифицированы все исследуемые гены, однако, их наличие в штаммах не всегда было 100%. Оказалось, что в некоторых исследуемых штаммах гены могут не идентифицироваться. При этом в 15 штаммах мы не обнаружили ни одного из представленных генов. Такие штаммы характеризуются скудным ослизнением клеток. У некоторых штаммов *R.leguminosarum* гены *prsD* и *prsE* не были найдены. Это можно объяснить тем, что они являются вспомогательными генами. Большой процент из исследуемых генов составил *rosR*, т.к. он играет ключевую роль в регуляции синтеза ЭПС среди всех описанных регуляторных генов, функционируя как положительный регулятор этого процесса.

Регуляция биосинтеза ЭПС важна для установления симбиотических отношений с бобовыми растениями, питания, защиты от вредных факторов окружающей среды, формирования биопленок. Чем больше ризобии синтезируют ЭПС, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00902А; №16-34-01076 мол_а; №17-44-020201р_а; РФФИ № 18-34-00033 мол_а.

Список использованной литературы

1. Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia //International journal of molecular sciences. – 2011. – Т. 12. – №. 11. – С. 7898-7933.
2. Rinaudi L. V., Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia //FEMS microbiology letters. – 2010. – Т. 304. – №. 1. – С. 1-11.
3. Skorupska A. et al. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions //Microbial cell factories. – 2006. – Т. 5. – №. 1. – С. 7.
4. Cheng H. P., Walker G. C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* //Journal of bacteriology. – 1998. – Т. 180. – №. 19. – С. 5183-5191.
5. 4. Ivashina T.V., Khmelnsky M.I., Shlyapnikov M.G., Kanapin A.A., Ksenzenko V.N. // Gene. 1994. V. 150. P. 111–116.
6. . Janczarek M., Skorupska A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates //International journal of molecular sciences. – 2011. – Т. 12. – №. 6. – С. 4132-4155.
7. Janczarek, M.; Skorupska, A. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *pssB* gene product is an inositol monophosphatase that influences exopolysaccharide synthesis. Arch. Microbiol. 2001, 175, 143–151.

УДК 579.262:579.6

Е. Э. Аксюкова, Г. С. Аздерханова, А. М. Лавина
**МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК,
 ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *RHIZOBIUM***

Научный руководитель – д.б.н., профессор Ал. Х. Баймиев

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, Башкирский государственный
 медицинский университет, г. Уфа

Институт биохимии и генетики, УФИЦ РАН, г. Уфа

Резюме. В результате проведенного детального микроскопического исследования структур, образованных ризобийными штаммами дикого типа и ризобиями с измененной экспрессией генов: *pssA* и *rosR* (гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов), а также с геном *rapA1* (ответственным за агглютинацию бактерий), нами было показано, что полученные рекомбинантные штаммы ризобий формируют более сложные архитектурные структуры биопленок по сравнению с дикими штаммами, а высокие показатели числа живых клеток от времени не всегда коррелируют со способностью штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

Ключевые слова: биопленки, *Rhizobium*, *pssA*, *rosR*, *rapA1*.

Е. Е. Aksyukova, G. S. Azderhanova, A. M. Lavina

**MICROSCOPIC STUDY OF THE STRUCTURE OF BIOFILMS OBTAINED BY BACTERIA OF
 THE GENUS *RHIZOBIUM***

Scientific Advisor – Ph. D. in Biological, Full professor Al. H. Baimiev

Department of Fundamental and Applied Microbiology, Bashkir State Medical University, Ufa

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa

Abstract. The detailed microscopic investigations of the structures formed by wild-type strains and altered gene expression of nodule bacteria that are *pssA* and *rosR* (such type of genes involved in exopolysaccharide biosynthesis) as well as *rapA1* gene (it is involved in bacteria agglutination) were conducted. Consequently, the investigated recombinant strains of nodule bacteria form more complex biofilms structures in comparison with wild strains; moreover high rate numbers of living cells are not always indicative of strain ability to fast form of mature biofilms.

Keywords: biofilm, *Rhizobium*, *pssA*, *rosR*, *rapA1*.

Введение. В настоящее время общепризнано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде биопленок. Биопленки - это бактериальные сообщества, состоящие из клеток, которые прикреплены к поверхности или друг к

другу, и заключены в матрике синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, демонстрирующие изменение фенотипа, выраженного изменением параметров роста и экспрессии специфических генов [1].

Микроорганизмы рода *Rhizobium* формируют биопленки на поверхности корней бобовых растений. Это сложный и строго регулируемый процесс, состоящий из нескольких стадий развития. На первом этапе происходит первичное прикрепление бактерий к поверхности корней бобовых, в котором участвуют как растительные лектины, так и бактериальные адгезины, необходимые для агрегации и стабилизации биопленки [7]. Следующий этап прикрепления требует синтеза бактериальных целлюлозных фибрилл, обеспечивающих необратимое связывание бактерий на корнях [4]. С последующим ростом и увеличением числа ризобий, активную роль в формировании биопленок играют экзо- и липополисахариды, а также Nod-факторы [3], обеспечивающие прочную адгезию. На этой стадии клетки активно делятся, а выделяемый матрикс удерживает вместе всю колонию.

Физиологическое значение образования биопленок ризобактериями состоит в создании и поддержании благоприятных условий для их существования. Исследования доказывают, что биопленки являются наиболее распространенной и выгодной стратегией жизни для бактерий в естественных средах [6], как структуры устойчивые к факторам стресса, таким как засуха, нехватка питательных веществ, УФ-излучение, хищничество и антибиоз [2,5].

В настоящее время многие механизмы формирования биопленок изучены, но тем не менее, до сих пор не представлено комплексного взгляда на образование биопленок, связанного с определением экспрессии генов, ответственных за различные стадии развития биопленок и их регуляцию. В виду этого цель данного исследования - изучение структуры биопленок, образуемых дикими и рекомбинантными по генам регуляции синтеза экзополисахаридов *pssA*, *rosR* и адгезина *rapA1*, штаммами бактерий рода *Rhizobium*.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали штаммы бактерий из рабочей коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: *R.leguminosarum* PVu5, *R.leguminosarum* THy2, *R.leguminosarum* TPr4, *R.leguminosarum* VSy12, *R.galegae* 0702 дикого типа и рекомбинантные по генам: *pssA*, *rosR* (гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов) и *rapA1* (ген, ответственный за аглютинацию бактерий). Нами были проведены детальные микроскопические исследования структур биопленок, окрашенных по методу Грама. Также оценили зависимость числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде, в течение 1, 4, 16, 24 и 48 часов, с построением кривой роста и размножения, представленной в виде логарифма.

Результаты и обсуждения. В случае разновидностей штамма *R.leguminosarum* PVu5 мы выяснили, что рост клеток рекомбинантных штаммов происходит интенсивнее по сравнению с диким штаммом, так как наибольшее количество клеток наблюдалось у штаммов *R.leguminosarum* PVu5 *rapA1* и

R.leguminosarum PVu5 *rosR*. Примечательным оказался тот факт, что эти же штаммы образовывали более сложные структуры биопленок (имелось большее количество выстроенных тяжей).

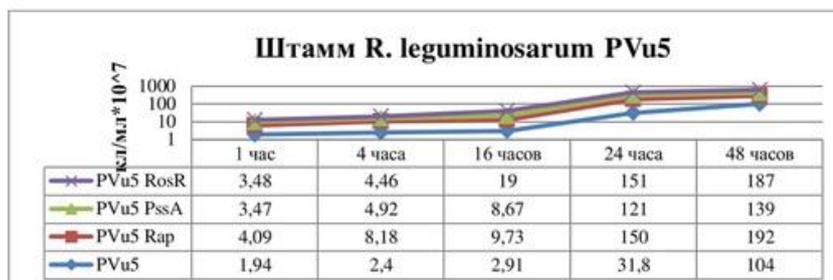


Рис. 1. Кривая роста и размножения штаммов *R.leguminosarum* PVu5 (дикий тип), *R.leguminosarum* PVu5 *rapA1*, *R.leguminosarum* PVu5 *pssA*, *R.leguminosarum* PVu5 *rosR*, представленная в виде логарифма.



Рис. 2. Биопленка, образованная штаммом *R.leguminosarum* PVu5 за 7 суток.

При микроскопировании разновидностей штамма *R. leguminosarum* THy2 биопленки наблюдались во всех случаях. Наибольшего развития достигла биопленка, образуемая штаммом *R.leguminosarum* THy2 *rapA1*, несмотря на то, что после 2-х суточных измерений показатель количества клеток данной культуры был незначительно ниже штамма дикого типа и сильно отставал от показателей штаммов *R.leguminosarum* THy2 *pssA* и *rosR*. Эти штаммы показали схожие результаты прироста клеток и степени образования биопленок.



Рис. 3. Биопленка, образованная штаммом *R.leguminosarum* THy2 за 7 суток.

Значения измерений количества клеток рекомбинантных разновидностей штамма *R.leguminosarum* TPr4 было примерно одинаковым и оказалось значительно выше штамма дикого типа. Несмотря на это биопленка, формируемая штаммом *R.leguminosarum* TPr4 дикого типа, находилась на более старшей стадии развития по отношению к биопленкам штаммом *R.leguminosarum* TPr4 *pssA* и *R.leguminosarum* TPr4 *rosR*. Наиболее быстрый рост клеток показал штамм *R.leguminosarum* TPr4 *rapA1*, в отношении которого мы наблюдали самую зрелую биопленку из всех изученных.

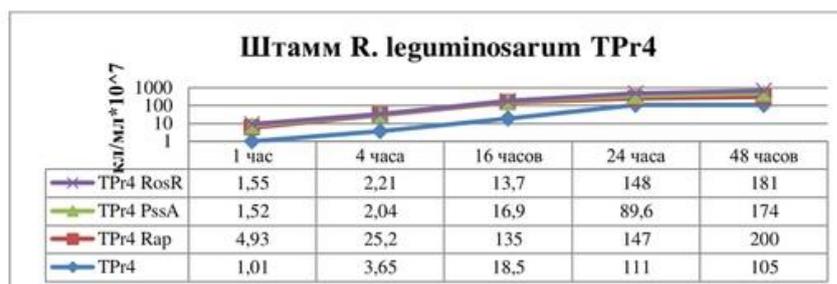


Рис. 4. Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* TPr4 (дикий тип), *R. leguminosarum* TPr4 rapA1, *R. leguminosarum* TPr4 pssA, *R. leguminosarum* TPr4 rosR, представленная в виде логарифма.



Рис. 5. Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* TPr4 за 7 суток.

Далее были проанализированы значения разновидностей штамма *R. leguminosarum* VSy12. Показатели штамма дикого типа в лаг-фазе, экспоненциальной фазе и фазе стационарного роста оказались выше некоторых показателей рекомбинантных штаммов. Однако при микроскопировании, именно в отношении данного штамма, встречалось самое большое количество единичных клеток, возможно это связано с тем, что для образования зрелой биопленки штамму *R. leguminosarum* VSy12 необходимо больше времени. В стационарной фазе наименьшее количество клеток показал штамм *R. leguminosarum* VSy12 rapA1, однако в его случае мы наблюдали образованную биопленку. Самая зрелая биопленка была у штамма *R. leguminosarum* VSy12 pssA.



Рис. 6. Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 за 7 суток.

Наивысшие средние показатели числа живых клеток от времени мы отметили у разновидностей штамма *R. galegae* 0702, причем как у штамма дикого типа, так и у рекомбинантных штаммов. Такой быстрый рост клеток сказался и на образовании биопленок, так как наиболее зрелые биопленки мы также отметили в этом случае. Несмотря на то, что гены pssA и rosR участвуют в биосинтезе экзополисахаридов у штаммов вида *R. leguminosarum*, при микроскопировании биопленок штаммов *R. galegae* 0702 с геном pssA или rosR, мы наблюдали зрелую биопленку, более сложной архитектуры по сравнению с биопленкой штамма дикого типа.



Рис. 7. Био пленка, образованная штаммом *R. galegae* 0702 за 7 суток.

Вывод. Проведенное детальное микроскопическое исследование структур, показало, что рекомбинантные штаммы ризобий по сравнению с дикими штаммами формируют более сложные архитектурные структуры биопленок, а высокие показатели числа живых клеток от времени далеко не всегда указывают на способность штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00902А; №16-34-01076 мол_а; №17-44-020201р_а; РФФИ № 18-34-00033 мол_а.

Список литературы:

1. Окулич В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с. : ил.
2. Стрелкова Е.А. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды / Е.А. Стрелкова, Н.В. Позднякова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, С.С. Беляев // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №2. – С. 131-138.
3. Цыганова А. В., Цыганов В. Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – №. 2. – С. 211-222.
4. Dazzo F.B., Truchet G.L., Sherwood J.E., Hrabak E.M., Abe M., Pankratz S.H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosist // Applied and environmental microbiology. 1984. - V. 48, № 6. - P. 1140-1150.
5. Flemming H.C. Biofilms and environmental protection // Wat. Sci. Tech. 1993. Vol. 27, №7-8. P. 1-10.
6. Fujishige N.A. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation / N.A. Fujishige N.N. Kapadia, P.L. De Hoff, A.M. Hirsch // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – V. 56. – № 2. – P. 195.



Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

**Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ**

Автор работы	Аздерханова Г.С.
Факультет, кафедра, номер группы	Б-401А
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА RHIZOBIUM
Название файла	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА RHIZOBIUM.docx
Процент заимствования	10,25%
Процент цитирования	0,88%
Процент оригинальности	88,87%
Дата проверки	14:49:04 22 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	22.06.2018
	 ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Аздерханова Гузель Салаватовна выполнила выпускную квалификационную работы на тему «Идентификация генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий рода *Rhizobium*».

Экзополисахариды (ЭПС) почвенных бактерий рода *Rhizobium* выполняют ряд важных функций, в числе которых формирование матрикса при образовании биопленок на поверхности корней растений. Поиск генов регуляции синтеза ЭПС у ризобий, которому посвящена выпускная работа Аздерхановой Г.С. важен для понимания их распространения в популяции бактерий и, следовательно, оценки способности выживаемости и конкурентоспособности штаммов. Работа написана довольно хорошим языком, правильно оформлена и состоит из классических разделов. Описание методик достаточно для их воспроизведения. Результаты подробно описаны и иллюстрированы.

За время обучения в БГМУ Аздерханова Г.С. проявила себя как ответственный, исполнительный, инициативный студент.

В процессе выполнения ВКР Аздерханова Г.С. изучила большой объем литературных источников. Она освоила основные молекулярно-биологические и микробиологические методы исследований, хорошо ориентируется по современным биологическим базам данных и имеет хорошую теоретическую подготовку.

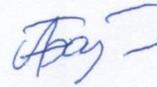
Полученные в ходе выполнения результаты были апробированы и доложены на 83-й Всероссийской научной конференции БашГМУ.

Считаю, что за годы обучения Аздерханова Г.С. сложилась как квалифицированный микробиолог, владеющий навыками работы с микроорганизмами и приобрела хороший багаж знаний, который поможет ей в будущей трудовой деятельности.

Общее заключение по работе:

РАБОТА ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ.

Научный руководитель:
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



Ал.Х. Баймиев

18 июня 2018 г.

ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук, профессора Максимова Игоря Владимировича на выпускную квалификационную работу Аздерхановой Гузель Салаватовны «Идентификация генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий рода *Rhizobium*»

Актуальность темы исследования.

Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов (ЭПС) контролируя количество выделяемых бактериями полисахаров, регулируют крайне важные для бактерий процессы, такие как коммуникации бактерий, образование колоний, защиту от неблагоприятных условий и т.д. Изучение распространённости подобных генов актуально, поскольку наличие их у бактерий в популяции часто определяет успешность выживания, обеспечивая, например, у клубеньковых бактерий, способность колонизации богатой питательными веществами поверхности корней растений.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Аздерханова Г.С. в своей работе оценила частоту встречаемости генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* у ризосферных бактерий *Rhizobium leguminosarum*. Полученные результаты позволяют оценить распространённость и сочетания вариантов встречаемости изучаемых генов и оценить их вклад в конечную продукцию ЭПС. На основании полученных результатов можно предложить методику первичной оценки штаммов клубеньковых бактерий при селекции промышленных штаммов

Достоверность и апробация результатов исследования.

В работе использованы адекватные методы работы с микроорганизмами. Проведена статистическая обработка полученных данных. Достоверность результатов не вызывает сомнений. Работа Аздерхановой Г.С. прошла апробацию на 83-й Всероссийской научной конференции БашГМУ.

Оценка содержания, завершенности и оформления ВКР.

Труд содержит новые знания о распространённости генов регуляции генов ЭПС в популяции клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum*. Оформление дипломной работы классическое. ВКР представляет собой небольшой, но вполне завершенный научный труд. Список цитированной литературы присутствует.

Соответствие направлению подготовки.

Работа полностью соответствует паспорту специальности – Биология (03.02.03 – микробиология).

Заключение. Таким образом, выпускная квалификационная работа Аздерхановой Гузель Салаватовны «Идентификация генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий рода *Rhizobium*», выполненная под руководством доктора биологических наук Баймиева Алексея Ханифовича является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01. – Биология (бакалавриат).

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии иммунитета Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН) (Адрес: Уфа, Проспект Октября, 71. Тел.: (347) 235-61-00; Факс: 235-60-88; E-mail: phyto@anrb.ru)

Игорь Владимирович Максимов



Доклад к защите дипломной работы Аздерхановой Г.С.

[1 слайд]

Уважаемые председатель и члены государственной экзаменационной комиссии, разрешите представить Вам доклад на тему:

«ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM*»

[2 слайд]

В род *Rhizobium* объединены почвенные бактерии, способные фиксировать азот атмосферы с образованием специальных структур (клубеньков) на корнях бобовых растений.

[3 слайд]

В первоначальном этапе формирования симбиотических отношений ризобии прикрепляются к поверхности корней растения-хозяина, а затем колонизируют их поверхность с образованием особых структур – биопленок..

[4 слайд]

Формирование биопленок – очень сложный, многофакторный и многостадийный процесс, так как биопленки представляют собой совокупность микроорганизмов, прикрепленных к твердой поверхности посредством выделяемого ими полимерного матрикса. Генетический контроль образования биопленок изучен недостаточно.

[5 слайд]

Бактериальные клетки, представленные в виде биопленок очень устойчивы к стрессам, включая антибактериальное лечение и дезинфекцию. С биопленочными инфекциями связаны многие хронические заболевания людей, растений и животных. Путем идентификации и изучения

бактериальных генов, которые участвуют в формировании биопленок, возможно, разработать лекарства или процедуры для профилактики или лечения инфекций, связанных с биопленками

В данной работе мы исследовали распространение в популяции клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* нескольких ключевых генов-регуляторов формирования биопленок. *pssA*, ответственного за инициацию биосинтеза экзополисахаридов, *pssB*, кодирующего инозитолмонофосфатазу, *rosR*, ответственного за регуляцию транскрипции, и *prsD* и *prsE*, отвечающие за секрецию белка NodO, который играет роль в передаче сигналов в процессе образования клубеньков.

[6 слайд]

Целью данного исследования являлось: идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий *Rhizobium leguminosarum*

[7 слайд]

В связи с поставленной целью были определены следующие задачи:

1. Проведение сравнительного анализа последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* зарегистрированных в GenBank.
2. Подбор специфичных праймеров к исследуемым генам.
3. Выделение геномной ДНК из ризобактерий.
4. Амплификация генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*.
5. Секвенирование, полученных при амплификации генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, последовательностей ДНК и их сравнение с последовательностями представленными в GenBank.
6. Скрининг штаммов *R. leguminosarum* на наличие генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*.

[8 слайд]

Объекты исследования. Объектами исследования являлись гены *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*. Материалом для исследования генов послужили 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (штаммы были изолированы из клубеньков 6 видов дикорастущих бобовых растений).

[9 слайд]

Методы исследования.

В работе использовали ряд микробиологических и молекулярно-биологических методов.

[10 слайд]

Результаты и обсуждения.

По результатам электрофореграмм, было выявлено, что:

- ген *pssA*, ответственный за инициацию биосинтеза ЭПС был идентифицирован у 26 ризобиальных штаммов,

[11 слайд]

- ген *pssB*, кодирующий инозитолмонофосфатазу - у 21,

[12 слайд]

- ген *rosR* ответственный за регуляцию транскрипции - у 32.

[13 слайд]

- ген *prsD*, отвечающий за секрецию белка NodO - у 21

[14 слайд]

- ген *prsE*, отвечающий за секрецию белка NodO - у 20 ризобиальных штаммов.

[15 слайд]

Проведенный скрининг штаммов *R. leguminosarum* на предмет наличия у них генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, показал, что из 99 исследуемых штаммов только 1 штамм имеет все исследуемые гены.

В результате скрининга нами были идентифицированы все исследуемые гены, однако, их наличие в штаммах не всегда было 100%. Оказалось, что в некоторых штаммах гены могут не идентифицироваться. При этом в 15 из них мы не обнаружили ни одного из представленных генов. Такие штаммы характеризуются скудным ослизнением клеток. У большинства штаммов гены *prsD* и *prsE* не были найдены. Это можно объяснить тем, что они являются вспомогательными генами в процессе синтеза ЭПС, так как основная роль их заключается в секреции белка NodO, который служит для образования каналов в растительной плазматической мембране и играет роль в передаче сигналов в процессе образования клубеньков.

[16 слайд]

Для наглядного отображения результатов на слайде приведена гистограмма. Она показывает, что больший процент из исследуемых генов составил *rosR*. Это связано с тем, что он играет ключевую роль в регуляции синтеза ЭПС, функционируя как положительный регулятор этого процесса. На 5 % ниже дал результат гена *pssA*, участвующего в первом этапе синтеза экзополисахаридов. Ген *pssB* наравне с геном *prsD* составили 21%. Самый низкий результат в идентификации был отмечен у гена *prsE*.

[17 слайд]

Регуляция биосинтеза ЭПС очень важна для установления симбиотических отношений с бобовыми растениями, питания, защиты от вредных факторов окружающей среды и формирования биопленок. Чем

больше ризобии синтезируют ЭПС, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»



Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Аздерханова Гюзель Салаватовна

«Идентификация генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий рода *Rhizobium*»

Научный руководитель - д.б.н., профессор Ал. Х. Баймиев

● Уфа 2018 ●



Актуальность

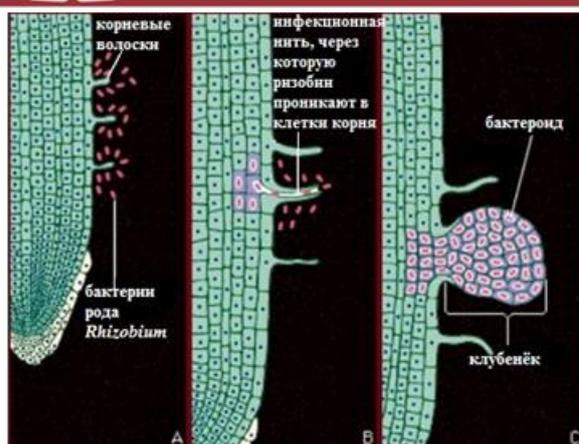


Азотфиксирующие клубеньки бактерий рода *Rhizobium* на корнях бобовых растений

2



Актуальность



Этапы формирования клубеньков:

- Белок на поверхности корневых волосков – лектин – «узнает» полисахарид наружной поверхности клеточной стенки бактерии и прочно связывается с ним.
- Проникновение бактерий внутрь клеток корня, за счет разрушения клеточной стенки ферментами растения и формирования инфекционной нити.
- Здесь ризобии активно делятся, и увеличиваясь в размерах становятся бактериондами, что способствует формированию клубеньков.

3



Актуальность

Биопленка – совокупность микроорганизмов, прикрепленных к твердой поверхности посредством выделяемого ими полимерного матрикса.

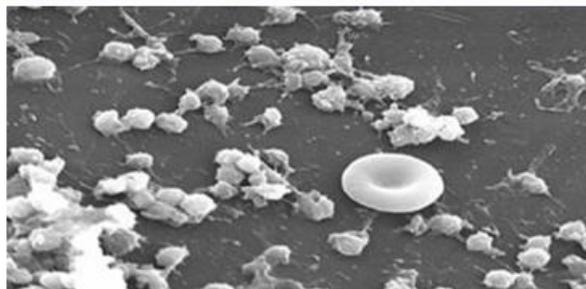


4



Актуальность

Путем идентификации и изучения бактериальных генов, которые участвуют в формировании биопленок, возможно, разработать лекарства или процедуры для профилактики или лечения инфекций, связанных с биопленкой.



Биопленка во внутривенном катеторе спустя 24 часа после его установки

5



Цель исследования

Идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий *Rhizobium leguminosarum*.

6



Задачи исследования

1. Проведение сравнительного анализа последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* зарегистрированных в GenBank.
2. Подбор специфичных праймеров к исследуемым генам.
3. Выделение геномной ДНК из ризобактерий.
4. Амплификация генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*.
5. Секвенирование, полученных при амплификации генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, последовательностей ДНК и их сравнение с последовательностями представленными в GenBank.
6. Скрининг штаммов *R. leguminosarum* на наличие генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*.

7)



Объекты исследования

Объекты исследования: гены *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* и 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (штаммы были изолированы из клубеньков 6 видов дикорастущих бобовых растений)

Растение-хозяин	Количество штаммов
Горошек заборный 9 / <i>Vicia sepium</i>	12
Горошек лесной 7 / <i>Vicia sylvatica</i>	11
Чина лесная 1 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12
Чина лесная 2 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12
Чина лесная 3 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10
Чина лесная 4 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10
Чина гороховидная 4 / <i>Lathyrus pisiiformis</i>	12
Чина луговая 5 / <i>Lathyrus pratensis</i>	10
Чина Литвинова 3 / <i>Lathyrus livinovi</i>	10

8]



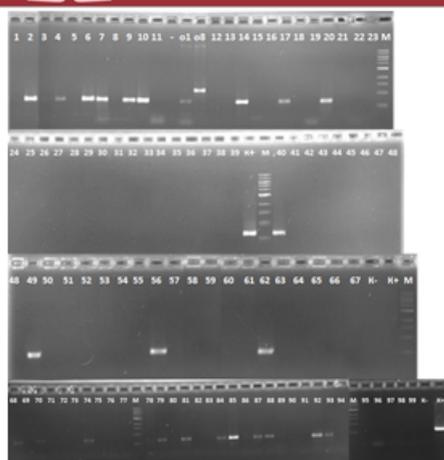
Методы исследования

- ДНК из выросших бактерий выделяли с использованием ионообменной смолы Chelex.
- Поиск заданной последовательности ДНК производили в GenBank на сайте ncbi.
- Подбор олигонуклеотидных праймеров осуществлялся в программе PrimerSelect.
- ПЦР проводилась с использованием стандартных наборов в амплификаторе Терцик МС-2 ("ДНК-технология", Россия) при оптимальной для каждой пары праймеров температуре отжига.
- Идентификацию продуктов амплификации осуществляли электрофоретически в 1%-ном горизонтальном агарозном геле с последующей визуализацией после окраски бромистым этидием в проходящем УФ-свете трансиллюминатора.

9



Результаты и обсуждения



Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *pssA*:

1- 99 штаммы *R. leguminosarum*,

К- отрицательный контроль

o1 – *R. leguminosarum* VSy12

o8 - *R. leguminosarum* THy1

К+,o1,o8 - положительные контроли

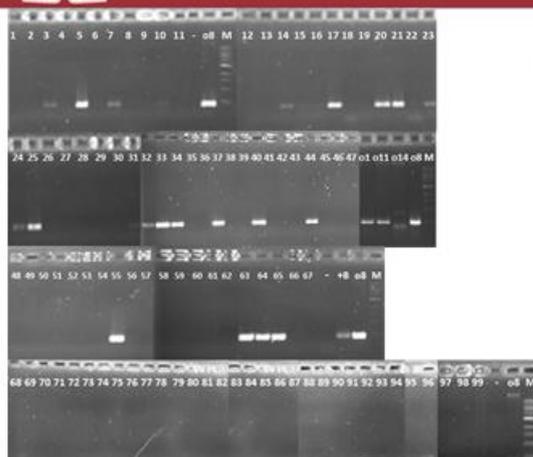
М – маркер, п.н.

Размер продукта анализа ПЦР составляет 660 п.н.

10



Результаты и обсуждения



Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *pssB*:

1- 99 штаммы *R. leguminosarum*,

К- отрицательный контроль

o1 – *R. leguminosarum* VSy12

o8 - *R. leguminosarum* THy1

o11 - *R. leguminosarum* Pvu5

o14 – *R. leguminosarum* TPr3

o1, o8, o11, o14 - положительные контроли

М – маркер, п.н.

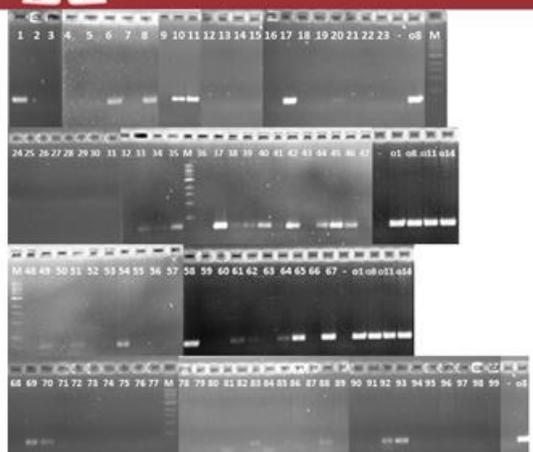
Размер продукта анализа ПЦР составляет

439 п.н.

11



Результаты и обсуждения



Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *rosR*:

1- 99 штаммы *R. leguminosarum*,

К- отрицательный контроль

o1 – *R. leguminosarum* VSy12

o8 - *R. leguminosarum* THy1

o11 - *R. leguminosarum* Pvu5

o14 – *R. leguminosarum* TPr3

o1, o8, o11, o14 - положительные контроли

М – маркер, п.н.

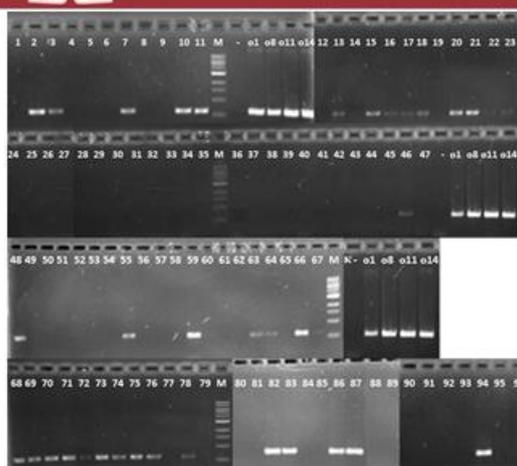
Размер продукта анализа ПЦР составляет 296

п.н.

12



Результаты и обсуждения



Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *prsD*:

1-99 штаммы *R. leguminosarum*,

К - отрицательный контроль

01 - *R. leguminosarum* VSy12

08 - *R. leguminosarum* THy1

011 - *R. leguminosarum* Pvu5

014 - *R. leguminosarum* TPr3

01, 08, 011, 014 - положительные контроли

М - маркер, п.н.

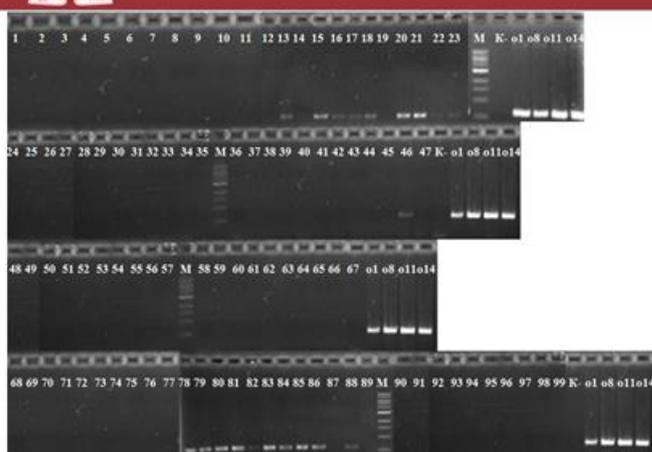
Размер продукта анализа ПЦР

составляет 614 п.н.

13



Результаты и обсуждения



Электрофореграмма амплификации ДНК *R. leguminosarum* на наличие гена *prsE*:

1-99 штаммы *R. leguminosarum*,

К - отрицательный контроль

01 - *R. leguminosarum* VSy12

08 - *R. leguminosarum* THy1

011 - *R. leguminosarum* Pvu5

014 - *R. leguminosarum* TPr3

01, 08, 011, 014 - положительные контроли

М - маркер, п.н.

Размер продукта анализа ПЦР составляет

439 п.н.

14



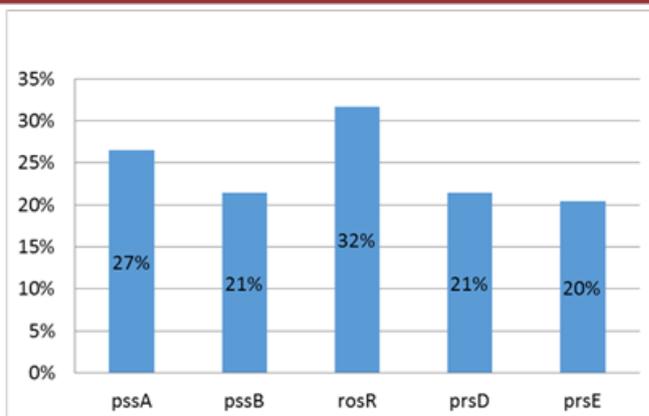
Скрининг штаммов *R. leguminosarum*

Растение-хозяин	Количество штаммов	<i>pssA</i>	<i>pssB</i>	<i>rosR</i>	<i>prsD</i>	<i>prsE</i>
Горошек заборный 9 / <i>Vicia sepium</i>	12	3	5	2	5	9
Горошек лесной 7 / <i>Vicia sylvatica</i>	11	6	3	3	2	0
Чина лесная 1 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12	0	6	3	0	0
Чина лесная 2 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	12	1	3	8	0	1
Чина лесная 3 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10	2	1	3	6	0
Чина лесная 4 / <i>Lathyrus sylvestris</i>	10	1	3	6	4	0
Чина гороховидная 4 / <i>Lathyrus pisiiformis</i>	12	7	0	2	0	10
Чина луговая 5 / <i>Lathyrus pratensis</i>	10	2	0	2	2	0
Чина Литвинова 3 / <i>Lathyrus litvinovii</i>	10	3	0	2	2	0

15



Идентифицированные в штаммах *R. leguminosarum* гены экзополисахаридов



16



Выводы

1. Проведен сравнительный анализ последовательностей генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, зарегистрированных в GenBank.
2. Произведен подбор специфичных праймеров к генам *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий *R. leguminosarum*.
3. С помощью ионообменной смолы Chelex были выделены ДНК из 99 штаммов *R. leguminosarum*.
4. Методом ПЦР были амплифицированы гены *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*.
5. Проведено секвенирование, полученных при амплификации генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, последовательностей ДНК и их сравнение с последовательностями, представленными в GenBank.
6. Проведен скрининг штаммов *R. leguminosarum* на наличие генов *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*. В результате проведенного скрининга из 99 штаммов *R. leguminosarum* был выявлен лишь 1 штамм ризобий, содержащий все исследуемые гены. Ген *pssA* был идентифицирован у 26 ризобинальных штаммов, ген *pssB* - у 21, ген *rosR* - у 31, ген *prsD* - у 20 и ген *prsE* у 21 ризобинального штамма.

17



Достижения и публикации



1. Аздерханова Г.С., Аксюкова Е.Э., Лавина А.М. Идентификация генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий рода *Rhizobium*. Вестник БГМУ: Сборник материалов 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2018). С. 1188-1192.
2. Аздерханова Г.С., Аксюкова Е.Э., Лавина А.М. Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых бактериями рода *Rhizobium*. Вестник БГМУ: Сборник материалов 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2018). С. 1201-1205.

18