

УДК 579.252.52+579.257:579.852.11

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ПЛАЗМИДЫ p19 ИЗ ПОЧВЕННОГО ШТАММА *Bacillus subtilis* 19, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ КОНЪЮГАЦИИ

© 2008 г. Е. У. Полуэктова<sup>1</sup>, Е. Ю. Гагарина<sup>1</sup>, И. П. Шиловский<sup>1</sup>, Е. А. Федорина<sup>1</sup>, В. З. Незаметдинова<sup>1</sup>, С. А. Родионова<sup>2</sup>, А. А. Прозоров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова Российской академии наук, Москва 119991; e-mail: epolu@vigg.ru;

<sup>2</sup>Институт проблем передачи информации Российской академии наук, Москва 127994

Поступила в редакцию 29.03.2007 г.

Клонированы и секвенированы два фрагмента конъюгативной плазмиды p19 (95 тпн) из почвенного штамма *Bacillus subtilis* 19; эти фрагменты несут гены, продукты которых необходимы для осуществления конъюгативного переноса. Один из фрагментов, величиной 4518 пн, несет пять открытых рамок считывания и их фрагментов (ORF1–ORF5). Белок, соответствующий ORF4, гомологичен белкам VirD4-семейства. Инактивация ORF4 и ORF1 с помощью инсерционного мутагенеза снижала частоту конъюгативного переноса плазмиды p19 на 3–5 порядков. На другом фрагменте p19 величиной 2932 пн идентифицированы *rep*-район, гомологичный *rep*-району плазмиды pBS72 из почвенного штамма *B. subtilis* 72, и одна новая ORF (ORF6); соответствующий ей белок имеет НТН-мотив, свойственный ДНК-связывающим белкам.

Наиболее распространенным способом переноса ДНК у бактерий является конъюгация. Способность к конъюгации определяется конъюгативными плазмидами или конъюгативными транспозонами. Плазмидные гены переноса (*tra*-гены) обычно объединены в 1–2 оперона. Механизмы конъюгации изучались преимущественно у *Escherichia coli* и других грам-отрицательных бактерий; у грам-положительных бактерий конъюгация была обнаружена позже и изучена значительно меньше [1–3].

Явление конъюгации у бактерий исследовалось в основном на *Bacillus thuringiensis* [4–7]. Хотя *B. subtilis* является вторым по изученности (после *E. coli*) объектом генетики микроорганизмов, у этой бактерии долгое время единственными способами переноса ДНК считали трансформацию и трансдукцию. Видимо, это объясняется тем, что лабораторный штамм *B. subtilis* 168 не несет плазмид. Позже у подвида *B. subtilis* – *B. natto* – и у природных почвенных штаммов *B. subtilis* 1387 и 19 были найдены крупные конъюгативные плазмиды, соответственно pLS20 [8], p1387-3 [9] и p19 [10]. Наиболее пригодной для изучения конъюгации является плаزمида p19, ее величина составляет около 95 тпн. Конъюгация с участием этой плазмиды происходит на плотных и в жидких средах. p19 передается реципиентам с частотой, близкой к 100%; плазмида способна мобилизовать мелкие плазмиды и передавать фрагменты хромосомы путем сексдукции [11, 12]. Мобилизация мелких плазмид сопровождается плазмидным ретропереносом [13].

О плазмидных генах, участвующих в конъюгативном процессе у бактерий, почти нет данных. Полная нуклеотидная последовательность определена только для одной плазмиды бактерий, у которой изучены конъюгативные свойства, – это pAW63 *B. thuringiensis* [14]. В нашей лаборатории проводятся идентификация и изучение генов *tra*-района плазмиды p19. В настоящей работе описаны выделение и свойства некоторых конъюгативных генов этой плазмиды.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штаммы бактерий и плазмиды.** В работе были использованы штаммы *B. subtilis* 168 (прототроф, лабораторный музей), *B. subtilis* 19(p19), *B. subtilis* 19(p19cat) Tra<sup>+</sup> и *B. subtilis* 19 (pV) Str<sup>R</sup> [15]; штаммы *E. coli* DH5α и XL1-Blue (“Stratagene”) [16]. Были использованы плазмиды p3, p19, p19cat [15], pBluescript (“Stratagene”), pMLT21C [17]. Прочие плазмиды и штаммы бактерий, полученные в данной работе, описаны в разделе “Результаты”.

**Питательные среды.** В качестве питательных сред использовали LB-агар и LB-бульон (“Sigma”). Антибиотики добавляли в среды в концентрациях 5 мкг/мл (хлорамфеникол) и 50 мкг/мл (ампициллин).

**Выделение плазмидной ДНК** из клеток *B. subtilis* и *E. coli* проводили щелочным методом [18]. ДНК, используемую для определения последовательности нуклеотидов, получали с помощью набора Wizard plus SV minipreps (“Promega”). Фраг-

менты ДНК из агарозы очищали с помощью набора Glass Milk фирмы “Силекс”.

Рестрикцию и лигирование ДНК осуществляли в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей ферментов (“Fermentas”, “Promega”).

Электрофорез ДНК проводили в 1%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере [18]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали *EcoRI*–*HindIII*-фрагменты ДНК фага  $\lambda$  (“Fermentas”).

Трансформацию компетентных клеток *B. subtilis* проводили по методу, принятому в нашей лаборатории [19], трансформацию клеток *E. coli* – кальциевым методом [18].

Конъюгативные скрещивания штаммов *B. subtilis* проводили как описано ранее [15]. Частоту конъюгации определяли как отношение числа клеток трансконъюгантов к числу клеток реципиента.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили с использованием ДНК-секвенатора ABI PRIZM 310 и набора реактивов Big Dye Terminator Kit v.3.0 (PE Applied Biosystems) в Центре ДНК-диагностики ИОГен РАН. В качестве матриц использовали клонированные и субклонированные в клетках *E. coli* фрагменты ДНК p19 со стандартными праймерами M13F и M13R, а также праймерами, синтезированными по определенной нуклеотидной последовательности (primer walking). Нуклеотидные праймеры были синтезированы фирмой “Синтол”. Последовательности нуклеотидов были определены по обеим цепям ДНК. ORF идентифицировали с помощью программы GeneMark.hmm Version 2.5 для прокариот с учетом кодирующего потенциала *B. subtilis* (<http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/>). Сигналы –35 и –10 были предсказаны на основании матрицы, составленной из определенных последовательностей промоторов *B. subtilis* [20]. Поиск гомологов был проведен на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью программы BlastP. Анализ белковых последовательностей осуществляли с помощью баз данных InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) и PFAM 21.0 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Трансмембранные домены идентифицировали с помощью программы TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Нуклеотидные последовательности 4518 пн и 2932 пн из плазмиды p19 были депонированы в базу данных GenBank под № EF506609 и № EF506610.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Способ клонирования участков *tra*-района плазмиды p19

Для клонирования различных участков p19, несущих гены конъюгации, мы использовали сле-

дующий подход. Плазида p19 имеет более 20 сайтов рестрикции эндонуклеазы *EcoRI*. В предыдущей работе в различные участки p19 по этим сайтам был введен селективный маркер устойчивости к хлорамфениколу (*cat*) в составе мелкой плазмиды p3 (3.8 тпн). Плазида p3 была получена в результате вставки фрагмента *HpaII* (1150 пн) pBD64 с геном *cat* в полилинкер pUC19; она способна реплицироваться в клетках *E. coli*, но не *B. subtilis* [11]. Наряду с клонами, осуществлявшими перенос крупной плазмиды с высокой частотой [*B. subtilis* 19 (p19cat) Tra<sup>+</sup>], было получено около 30 клонов *B. subtilis* 19 (p19cat) Tra<sup>–</sup> с полной потерей способности к конъюгации. Вероятно, у этих клонов инактивировались некоторые гены *tra*-района. Мы использовали клоны с инсерцией для последующего клонирования и секвенирования фрагментов p19, прилегающих к интегрированной p3. У этой мелкой плазмиды нет сайтов узнавания для рестриктазы *ClaI*; p19 имеет около 20 таких сайтов. Плазмидная ДНК из ряда клонов, неспособных к конъюгации, была рестрицирована ферментом *ClaI*, обработана лигазой и использована для трансформации клеток *E. coli* DH5 $\alpha$ . Селективными маркерами были устойчивость к хлорамфениколу и ампициллину. В результате удалось получить серию плазмид p3-19, состоявших из p3 и фрагментов ДНК p19.

### Характеристика секвенированных участков плазмиды p19

Два фрагмента ДНК p19, клонированные на плазидах p3-19-18 и p3-19-10, были секвенированы. Большой из секвенированных фрагментов имел величину 4518 тпн. На нем было идентифицировано пять открытых рамок считывания (ORF) (рис. 1, табл. 1). ORF2, 3, 4 соответствовали целым генам, ORF5 – началу гена, а ORF1 – скорее всего, концу гена. Конец ORF2 и начало ORF3 перекрывались. Все эти ORF, кроме неполной ORF1, имели предполагаемые сайты связывания с рибосомами и транскрибировались в одном направлении. Промотор был идентифицирован только для ORF2. Вероятно, ORF3, ORF4, ORF5 входят в один оперон. Вхождение в состав одного или двух оперонов характерно для *tra*-генов конъюгативных плазмид.

Характеристика ORF1–5 приведена в табл. 1. Продукт ORF4 принадлежит белкам TraG/TraD/VirD4-семейства. Белки данного семейства идентифицированы в системах конъюгации как грам-отрицательных, так и грам-положительных микроорганизмов. Продукт ORF4 содержит TraG-домен (аминокислоты 174–621), включающий в себя два нуклеозидтрифосфат-связывающих мотива (Walker A, B), и два трансмембранных района (аминокислоты 21–43 и 77–95). Он более всего схож с соответствующим белком плазмиды

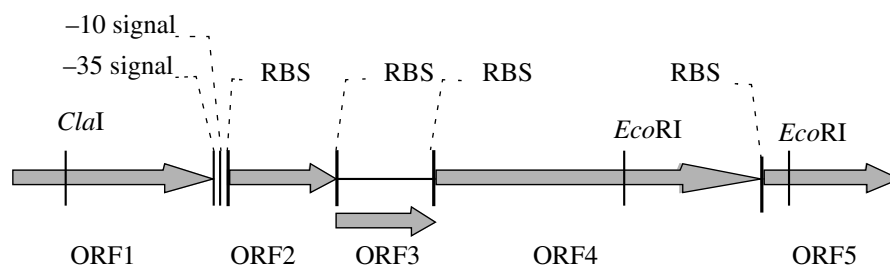


Рис. 1. Схема расположения ORF на фрагменте ДНК плазмиды p19 величиной 4518 пн.

pCP13 *Clostridium perfringens*, pX02 *B. anthracis*, а также с TraG/VirD4-подобными белками некоторых плазмид *B. thuringiensis* (pAW63, p9727) и *Enterococcus faecium* (pHT $\beta$ ) (табл. 1 и 2, см. также раздел “Обсуждение”). Ген VirD4-подобного белка плазмиды pAW63 содержит интрон II типа [14]; ORF4 интронов не содержит. Аминокислотная последовательность, соответствующая ORF1, кодирует С-конец белка, который содержит Torprim (toroisomerase-primase) мотив (аминокислоты 122–205). Наибольшее сходство предполагаемый белковый продукт ORF1 имеет с праймазой-хеликазой плазмид *Lactobacillus delbrueckii* pLBB1, pLL1212, pN42, pJBL2 [21, 22]. Аминокислотные последовательности, соответствующие остальным трем ORF, расположенным на данном фрагменте p19 (ORF2, ORF3 и ORF5, соответствующая N-концу белка), гомологов в базе данных не имели; для всех трех ORF на N-концах предполагаемых белков были обнаружены трансмембранные домены.

Был секвенирован также фрагмент ДНК p19 величиной в 2932 пн. Этот фрагмент был получен следующим образом. Вначале был клонирован EcoRI-ClaI-фрагмент величиной в 1.1 тпн из плазмиды p3-19-10. Этот фрагмент был использован как зонд для поиска посредством дот-гибридизации гомологичного, более крупного фрагмента из EcoRI-клонотеки p19, созданной на векторе pBluescript в клетках *E. coli* XLI Blue (Незаметди-

нова, неопубликованные данные). Такой EcoRI-фрагмент p19 был найден в составе плазмиды pBluescript-6. Величина клонированного фрагмента составила 2932 пн. Большая часть секвенированного фрагмента (около 2.6 тпн) оказалась полностью гомологичной rep-району крупной плазмиды pBS72, ранее клонированному и секвенированному [23] (см. рис. 2), и содержала две целые ORF, начало третьей и ориджин репликации (*ori*). Для того, чтобы подтвердить наличие в данном фрагменте функционально активных генов, необходимых для репликации, мы включили в плазмиду pBluescript-6 ген *cat* в составе Pst1-кассеты из плазмиды p9 (pBR322, содержащая ген *cat* из pC194; лабораторный музей). Такой гибридной плазмидой, несущей селективный ген *cat*, трансформировали клетки *B. subtilis* 168 по устойчивости к хлорамфениколу. Оказалось, что pBluescript-6 *cat* была способна после трансформации клеток *B. subtilis* реплицироваться в них. Таким образом, искомый фрагмент p19 действительно несет функционально активный rep-район.

На клонированном фрагменте p19 был еще участок ДНК, расположенный слева от rep-района, который не был секвенирован у pBS72. На этом участке располагалась одна ORF (ORF6, см. рис. 2). Она соответствовала белку в 129 аминокислот; белок содержал НТН-мотив (helix-turn-helix), свойственный ДНК-связывающим белкам. Для ORF6 был идентифицирован предполагае-

Таблица 1. Характеристика открытых рамок считывания, расположенных на фрагменте в 4518 пн конъюгативной плазмиды p19

ORF p19	GC-состав, %	Число аминокислот	RBS-сайт	Наиболее близкий белок-гомолог; число аминокислот в нем	Кому принадлежит белок-гомолог (плазмида и ее хозяин)
ORF1	30.1	>352	–	Праймаза-хеликаза; 688	pLBB1, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
ORF2	33.8	132	TGGAGG	–	–
ORF3	34.7	118	AGGAGA	–	–
ORF4	34.5	796	AGGGGG	VirD4-подобный белок; 788	pX02, <i>B. anthracis</i>
ORF5	29.9	>66	AGGAGG	–	–

**Таблица 2.** Гомология ORF4 p19 (733 аминокислотных остатка) с TraG/TraD/VirD4-подобными белками крупных плазмид бацилл и некоторых других бактерий

Плазмида, бактерия-хозяин	Число аминокислотных остатков в белке	Процент тождества	Процент сходства	Величина сравнимого участка белка (в аминокислотных остатках)
pX02, <i>B. anthracis</i>	611	39 46	58 61	379 71
pAW63, <i>B. thuringiensis</i>	877	38 41	56 58	385 236
p9727, <i>B. thuringiensis</i>	877	38 41	57 60	375 236
pBMB67, <i>B. thuringiensis</i>	638	34	53	420
pCP13, <i>Clostridium perfringens</i>	913	37 45	52 62	478 308
pHTbeta, <i>Enterococcus faecium</i>	952	31 38	51 55	472 248
pMC01, <i>Lactococcus lactis</i>	530	26	48	412
pF3028, <i>Haemophilus influenzae</i>	610	22	44	348
RP4, <i>E. coli</i>	635	25	40	409
pSI01, <i>Vibrio cholerae</i>	550	22	41	359

мый сайт связывания с рибосомами. Промотор ORF6, вероятно, находится слева, вне секвенированной последовательности. О возможном участии ORF6 в конъюгации см. ниже.

#### Инактивация идентифицированных ORF p19

Для того чтобы подтвердить, что продукты идентифицированных ORF участвуют в конъюгационном переносе, мы инактивировали три из них – ORF1, ORF4, ORF6 – с помощью инсерционного мутагенеза. Как было описано выше, ORF1 и ORF4 были клонированы в составе p3-19-18, ORF6 была клонирована в составе pBluescript-6. Далее фрагменты ORF (*Cla*I-*Hpa*I-фрагмент ORF1 величиной 430 пн; *Eco*RI-*Bgl*II-фрагмент ORF4 величиной 874 пн; *Eco*RI-*Sau*3AI-фрагмент ORF6 величиной 236 пн) встраивались в векторные плазмиды, неспособные реплицироваться в клетках *B. subtilis*, но несущие экспрессирующийся в них маркер *cat* (pMTL21C для ORF1 и ORF6, p3 для ORF4). Были получены гибридные плазмиды pMLT21C-1, pMLT21C-6, p3-4. Затем проводили трансформацию клеток штамма *B. subtilis* 19(p19) такими гибридными плазмидами; селективным маркером была устойчивость к хлорамфениколу. Ожидалось, что гибридные плазмиды

будут встраиваться в ДНК p19 в результате гомологичной рекомбинации по участку ДНК той ORF, которая подлежала проверке. Встраивание должно было в той или иной мере “испортить” эту ORF (см. рис. 3). В свою очередь, это сказало бы на конъюгативных свойствах трансформантов, несущих соответствующую ORF. Полученные трансформанты, устойчивые к хлорамфениколу, проверялись затем на способность быть донорами в конъюгативных скрещиваниях с реципиентом *B. subtilis* 19 (pV) Str<sup>R</sup>. Были проверены по два клон штаммов *B. subtilis* 19 (p19::pMLT21C-1); *B. subtilis* 19 (p19::p3-4); *B. subtilis* 19 (p19::pMLT21C-6). При использовании в качестве донора в конъюгативных скрещиваниях штамма *B. subtilis* 19 (p19cat) Tra<sup>+</sup> (положительный контроль) частота конъюгации составляла около 100%, считая на клетку реципиента. При использовании в качестве доноров клонов штамма *B. subtilis* 19 (p19::p3-4) частота конъюгации падала на 4 порядка. При использовании в качестве доноров двух разных клонов штамма *B. subtilis* 19 (p19::pMLT21C-1) частота конъюгации была снижена на 3 и 5 порядков. При использовании в качестве доноров клонов штамма *B. subtilis* 19 (p19::pMLT21C-6) частота конъюгации не отличалась от таковой для штамма *B. subtilis* 19

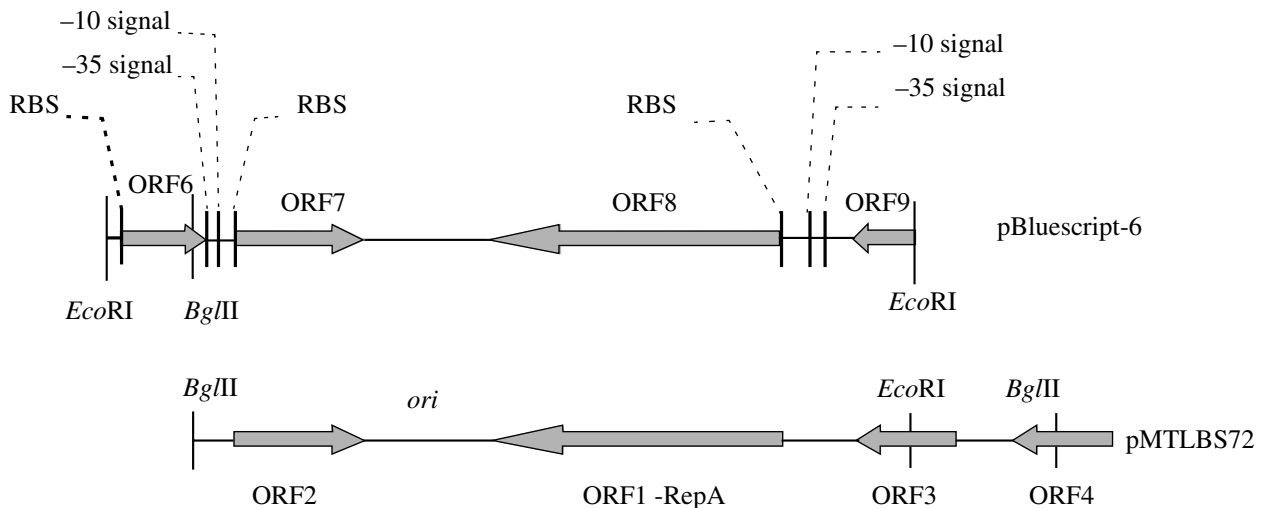


Рис. 2. Сопоставления EcoRI-фрагмента p19 (2932 пн), клонированного на pBluescript-6, и гомологичного BglIII-фрагмента pBS72 (3081 пн), клонированного на pMTLBS72 [23].

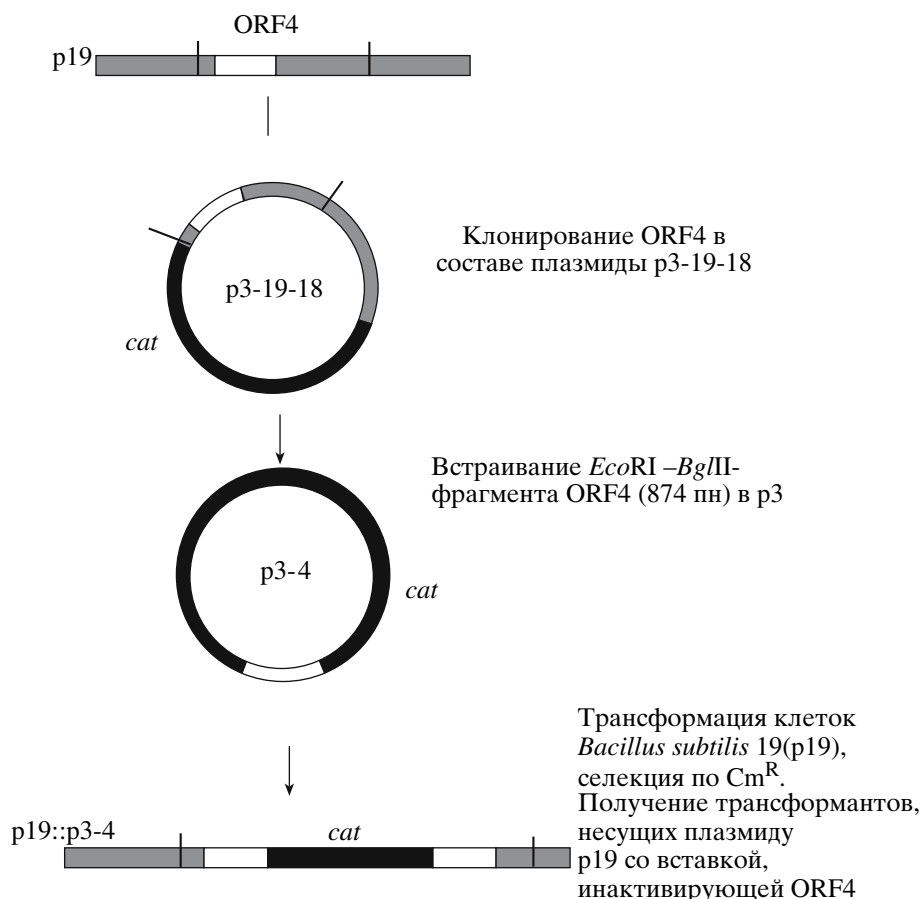
(p19cat) Tra<sup>+</sup>. Таким образом, в результате инсерционной инактивации на плазмиде p19 ORF1 и ORF4 способность плазмиды к конъюгационному переносу снижалась на несколько порядков, а при инактивации ORF6 – не менялась.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Предполагаемые гены конъюгации у p19 были обнаружены на фрагменте ДНК размером 4518 пн. Один из них – ORF4 (см. рис. 1); соответствующий белок принадлежит к многочисленному семейству TraG/TraD/VirD4-подобных белков (они же – CP-белки, coupling proteins). Конъюгативные CP-белки участвуют во всех системах конъюгации у бактерий (кроме актиномицетов). Соответствующие гены обнаружены и на плазмидах бацилл. Именно с продуктами этих генов, присутствующих у плазмид *B. anthracis*, *B. thuringiensis* и других плазмид грам-положительных бактерий, и была выявлена наиболее заметная степень гомологии у ORF4. Степень гомологии с CP-белками плазмид некоторых грам-отрицательных бактерий оказалась меньше (см. табл. 2). Очищены и изучены CP-белки только у нескольких плазмид грам-отрицательных бактерий. Изученные CP-белки связаны с внутренней мембраной клетки: С- и N-концы белков находятся в цитоплазме, а небольшой фрагмент белка находится в периплазме. CP-белки являются “молекулярными моторами” конъюгации, они осуществляют вход ДНК донора в составе релаксосомы в конъюгативный канал, возникающий между обеими клетками-партнерами. Тем самым эти белки объединяют обе группы основных процессов конъюгации: процессы, связанные с репликацией и транспортом ДНК клетки-донора

(dtr, DNA transfer and replication), и собственно спаривание клеток-партнеров (mpf, mating pair formation). TraG/TraD/VirD4-подобные белки являются компонентами многих систем секреции IV типа [24–27].

Аминокислотная последовательность, соответствующая С-концу ORF1 данного фрагмента ДНК, содержит Torpin-домен. Этот консервативный домен является общим для DnaG-праймаз, топоизомераз, нуклеаз OLD-семейства и репаративного белка RecR/M. Расположение ORF1 в непосредственной близости от ORF4, кодирующей белок – гомолог VirD4, и тот факт, что инсерция мелкой плазмиды pMLT21C-1, несущей участок ORF1, приводила к сильному снижению способности к конъюгации у p19, позволяют предполагать, что ORF1 относится к генам конъюгации, а не репликации. Хеликазная активность может быть присуща некоторым белкам конъюгации. Так, эта активность обнаружена у С-концевых доменов релаксаз – важнейших ферментов dtr-комплекса плазмид Inc F, N, W групп несовместимости. Белок TraE плазмиды RP4 является топоизомеразой III. Существует предположение, что ДНК-хеликазная активность может не только обуславливать разделение цепей ДНК, передаваемой при конъюгации и сохраняемой в клетке-доноре, но и обуславливать движущую силу, способствующую передвижению ДНК через бактериальные мембраны [27]. Белки, соответствующие остальным ORF этого фрагмента ДНК (ORF2, ORF3, ORF5), гомологов в банке данных не имеют. Однако расположение этих ORF в непосредственной близости к ORF1 и ORF4, отсутствие собственных промоторов у ORF3 и ORF5, а также наличие трансмембранных районов у всех трех ORF позволяет предположить, что они принадлежат к одному tra-опе-



**Рис. 3.** Инактивация генов плазмиды p19 с помощью инсерционного мутагенеза на примере ORF4. Черным цветом изображена ДНК векторной плазмиды p3, серым – ДНК плазмиды p19, незакрашен – *EcoRI*-*BglIII*-фрагмент ORF4 величиной 874 пн. Вертикальные линии ограничивают ORF4.

рону. Наличие трансмембранных районов свойственно многим предполагаемым конъюгативным белкам плазмид грам-положительных микроорганизмов [28].

У грам-положительных микроорганизмов описаны две группы плазмид, имеющих – внутри каждой группы – очень сходные *tra*-районы. Первую группу составляют плазмиды pMRC01 лактококков, pIP501 и pRE25 энтерококков, pSK41 стафилококков [3]. Ко второй группе относятся плазмиды pAW63 и p9727 *B. thuringiensis*, pX02 *B. anthracis* [14], а также pHTβ *E. faecium* [29]. ORF4 p19 имеет большую гомологию с TraG/VirD4-подобными белками второй группы, чем с белками первой (см. табл. 2). Используя различные плазмиды серии p3-19, мы секвенировали участки ДНК p19, прилегающие к p3. На двух плаزمиде мы обнаружили фрагменты ORF, гомологичные двум другим Tra-белкам плазмиды pAW63, принадлежащей ко второй группе, – ДНК-топоизомеразе и VirB4-подобному белку (неопубликованные данные). Это подтверждает сходство Tra-белков p19 и плазмид группы pAW63. Однако идентичность аминокислотных

последовательностей Tra-белков у плазмид второй группы составляет 60–90%, а между аминокислотной последовательностью, соответствующей ORF4 p19, и предполагаемыми белками плазмид второй группы – не более 46%. Можно предполагать, что Tra-белки p19 составляют особую группу, близкую, но не идентичную белкам группы pAW63.

Секвенированный фрагмент p19 величиной 2932 пн содержал репликативный район этой плазмиды. Аминокислотная последовательность, соответствующая находящейся на фланге *rep*-района ORF6, имела НТН-мотив, свойственный ДНК-связывающим белкам; она была гомологична многим белкам грам-положительных микроорганизмов (факторы транскрипции, ДНК-связывающие белки). Гомологии соответствующего предполагаемого белка с уже известными белками конъюгации обнаружить не удалось. Инсерционная инактивация ORF6 плазмиды p19 не влияла на частоту конъюгативного переноса p19. С другой стороны, инсерция плазмиды p3 в этот участок p19 лишала крупную плазмиду конъюгативных свойств, благодаря чему и был “опознан” со-

ответствующий клон *B. subtilis* 19(p19cat)Tra<sup>-</sup>. В настоящий момент мы не можем однозначно сказать, участвует ли продукт ORF6 в процессе конъюгации или нет.

Секвенированный нами *rep*-район плазмиды p19 был полностью идентичен *rep*-району плазмиды pBS72. p19 и pBS72 входят в группу плазмид, выделенных из почвенных штаммов *B. subtilis* на территории Беларуси. Плазмиды этой группы имеют сходную величину и по данным, полученным с помощью ПЦР и ДНК-ДНК-гибридизации, – гомологичные *rep*-районы [23, 30]. Наши данные подтверждают идентичность *rep*-районов плазмид. Недавно в нашей лаборатории было показано, что восемь плазмид из этой группы имеют еще одно общее свойство – способность осуществлять с высокой частотой конъюгативный перенос плазмид [31]. Возможно, что *tra*-районы этих плазмид сходны. В настоящее время мы занимаемся выяснением этого вопроса.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 04-04-48078 и 07-04-00911).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrup L. Conjugation in Gram-positive bacteria and kinetics of plasmid transfer // APMS suppl. 84. 1998. V. 106. P. 47–55.
2. Прозоров А.А. Конъюгация у бацилл // Микробиология. 2003. Т. 72. № 5. С. 517–527.
3. Grohmann E., Muth G., Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 277–301.
4. Gonzalez J., Carlton B.C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* // Plasmid. 1984. V. 11. P. 38–38.
5. Andrup L., Damgaard J., Wassermann K. Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 6530–6536.
6. Andrup L., Jorgensen O., Wilcks A., et al. Mobilization of “nonmobilizable” plasmids by the aggregation-mediated conjugational system of *Bacillus thuringiensis* // Plasmid. 1996. V. 36. P. 75–85.
7. Wilcks A., Jayaswal N., Lereclus D., Andrup L. Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 // Microbiology. 1998. V. 144. P. 1263–1270.
8. Koehler T.M., Thorne C.B. *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 5271–5278.
9. Полуэктова Е.У., Незаметдинова В.З., Прозоров А.А. Крупная конъюгативная плаزمид из почвенного штамма *Bacillus subtilis* // Генетика. 2000. Т. 36. № 7. С. 1000–1002. (Poluektova E.U., Nezametdinova V.Z., Prozorov A.A. Large conjugative plasmid from soil *Bacillus subtilis* strain // Rus. J. Genetics. 2000. V. 36. № 7. P. 826–828.)
10. Лотарева О.В., Полуэктова Е.У., Туток М.А., Прозоров А.А. Крупная плазмид из почвенного штамма *Bacillus subtilis*, осуществляющая конъюгативную мобилизацию с высокой частотой // Докл. РАН. 2001. Т. 379. № 1. С. 130–131.
11. Poluektova E.U., Fedorina E.A., Lotareva O.V., Prozorov A.A. Plasmid transfer in bacilli by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain // Plasmid. 2004. V. 52. P. 212–217.
12. Лотарева О.В., Прозоров А.А. Изучение конъюгативной передачи хромосомных и плазмидных генов у *Bacillus subtilis* // Докл. РАН. 2006. Т. 408. № 3. С. 422–425.
13. Лотарева О.В., Шиловский И.П., Прозоров А.А. Явление плазмидного ретропереноса при конъюгации у *Bacillus subtilis* // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1735–1738 (Lotareva O.V., Shilovski I.P., Prozorov A.A. A phenomenon of plasmid retrotransfer in conjugation of *Bacillus subtilis* // Rus. J. Genetics. 2006. V. 42. № 12. P. 1467–1469.)
14. Van der Auwera G.A., Andrup L., Mahillon J. Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727 // BMC Genomics. 2005. 6. 103.
15. Полуэктова Е.У., Федорина Е.А., Прозоров А.А. Конъюгативный перенос крупной плазмиды p19 у различных штаммов *Bacillus subtilis* // Генетика. 2005. Т. 41. № 5. С. 601–606 (Poluektova E.U., Fedorina E.A., Prozorov A.A. Conjugative transfer of the large plasmid p19 in various *Bacillus subtilis* strains // Rus. J. Genetics. 2005. V. 41. № 5. P. 479–483.)
16. Bullock W.O., Fernandez J.M., Short M.J. X-L1blue, a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection // BioTechniques. 2000. V. 5. P. 376–378.
17. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. The pMTL cloning vectors, I. Improved polylinker regions to facilitate the generation of sonicated DNA for nucleotide sequence // Gene. 1988. V. 68. P. 139–149.
18. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
19. Прозоров А.А. Трансформация у бактерий. М.: Наука, 1988. С. 176–185.
20. Helmann J.D. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: Evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 2351–2360.
21. Azcarate-Peril M., Raya R.R. Sequence analysis of pLBB1, a cryptic plasmid from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* // Can. J. Microbiol. 2002. V. 48. P. 105–112.
22. Bourniquel A.A., Casey M.G., Mollet B., Pridmore R.D. DNA sequence and functional analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* plasmids pN42 and pJBL2 // Plasmid. 2002. V. 47. P. 153–157.
23. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V. et al. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector // Plasmid. 2003. V. 49. № 1. P. 53–62.

24. *Gomis-Ruth F.X., de la Cruz F., Coll M.* Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer // *Res. Microbiol.* 2002. V. 153. № 4, P. 199–204.
25. *Llosa M., de la Cruz F.* Bacterial conjugation: A potential tool for genomic engineering // *Res. Microbiol.* 2005. V. 156. № 1. P. 1–6.
26. *Schroder S., Lanka E.* The mating pair formation system of conjugative plasmids – A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA // *Plasmid.* 2005. V. 54. № 1. P. 1–25.
27. *Zechner E.L., de la Cruz F., Eisenbrandt R. et al.* Conjugative DNA transfer processes // *The Horizontal Gene Pool* / Ed. Thomas C.M. Amsterdam: Harwood Acad. Publ., 2000. P. 87–174.
28. *Chao L., Qiyu B., Fuping S. et al.* Complete nucleotide sequence of pBMB67, a 67-kb plasmid from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1520 // *Plasmid.* 2007. V. 57. P. 44–54.
29. *Tomita H., Ike Y.* Genetic analysis of transfer-related regions of the vancomycin resistance *Enterococcus* conjugative plasmid pHT $\beta$ : Identification of *oriT* and putative relaxase gene // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 22. P. 7727–7737.
30. *Лагодич А.В., Штанюк Я.В., Прозоров А.А., Туток М.А.* Характеристика систем репликации плазмид природных штаммов *Bacillus subtilis* // *Молекуляр. биология.* 2004. Т. 38. № 3. С. 437–441.
31. *Незаметдинова В.З., Федорина Е.А., Полуэктова Е.У. и др.* Способность к конъюгации и сравнительная характеристика крупных плазмид, содержащихся в природных штаммах *Bacillus subtilis* из различных регионов Восточно-Европейской равнины // *Микробиология.* 2007. Т. 76. № 2. С. 215–222.

### Molecular Analysis of Some Genes from Plasmid p19 of the Soil Strain *Bacillus subtilis* 19 Involved in Conjugation

E. U. Poluektova<sup>a</sup>, E. Yu. Gagarina<sup>a</sup>, I. P. Shilovskii<sup>a</sup>, E. A. Fedorina<sup>a</sup>, V. Z. Nezametdinova<sup>a</sup>, S. A. Rodionova<sup>b</sup>, and A. A. Prozorov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: epolu@vigg.ru

<sup>b</sup> Institute of Problems of Information Transfer, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127994 Russia

Two fragments of conjugative plasmid p19 (95 kb) from the soil strain *Bacillus subtilis* 19 were cloned and sequenced; these fragments carry genes, products of which are indispensable for the conjugative transfer. One of the fragments 4518 bp in size carries five open reading frames and their fragments (ORF1–ORF5). The protein corresponding to ORF4 is homologous to proteins from the family VirD4. Inactivation of ORF4 and ORF1 by insertional mutagenesis caused a three-to-fivefold decrease in the frequency of plasmid p19 conjugative transfer. Another 2932-bp fragment of p19 was shown to possess a *rep* region homologous to the *rep* region of plasmid pBS72 from the soil strain *B. subtilis* 72 and a novel ORF (ORF6); the protein corresponding to this ORF contains the HTH motif typical for DNA-binding proteins.