

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ДИССИМИЛЯЦИОННОГО СЕРНОГО МЕТАБОЛИЗМА У ПЕРВОГО ЛИТОТРОФНОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ РОДА *AZOSPIRILLUM* — *A. THIOPHILUM*

К. С. Лавриненко<sup>1</sup>, Е. Н. Фролов<sup>2</sup>, М. Н. Тутукина<sup>3</sup>, Л. И. Юревич<sup>1</sup>,  
Е. В. Белоусова<sup>1</sup>, М. Ю. Грабович<sup>1</sup>

*Воронежский государственный университет*

*Институт биофизики клетки РАН*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрабина РАН*

Поступила в редакцию 29.07.2011 г.

**Аннотация.** Благодаря использованию методов молекулярной биологии была подтверждена способность представителя рода *Azospirillum* — *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> к литотрофному росту за счет окисления тиосульфата, используемого в энергетическом метаболизме. Впервые была получена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *soxB*, анализ которой показал высокий уровень гомологии с аналогичным геном других сероокисляющих бактерий. Кроме того, была показана зависимость его экспрессии от степени аэрации среды — в микроаэробных условиях культивирования по сравнению с аэробными уровень *soxB*-мРНК увеличивался более чем в 6 раз. Полученные данные подтверждают результаты биохимических исследований — основным фактором, определяющим тип метаболизма у *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> в присутствии восстановленных соединений серы, является концентрация кислорода.

**Ключевые слова:** серный метаболизм, SOX комплекс, литотрофный рост, экспрессия гена.

**Abstract.** Using methods of biochemistry and molecular biology we have confirmed the ability of *Azospirillum* genus representative *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> to grow lithotrophically due to thiosulfate oxidation, which is used in energetic metabolism. Nucleotide sequence of *soxB* gene fragment was obtained for the first time suggesting its high homology with other sulfur oxidizing bacteria. Furthermore, *soxB* expression level displayed evident dependence on media aeration — during microaerobic growth *soxB*-mRNA level was 6-fold higher as compared to aerobic cultivation. The data obtained by qRT-PCR are in line with biochemistry assays and support the suggestion that oxygen concentration is the key factor determining metabolic type of *Azospirillum thiophilum* sp. nov. strain BV-S<sup>T</sup> in the presence of reduced sulfur compounds.

**Keywords:** sulfur metabolism, SOX complex, lithotrophic growth, gene expression.

### ВВЕДЕНИЕ

Впервые род *Azospirillum* был описан Tarrand с коллегами (1978) и на тот момент включал два вида *A. lipoferum*, *A. brasilense* [1]. Сейчас же род *Azospirillum* представлен четырнадцатью видами и, кроме вышеперечисленных, включает следующие виды: *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinaerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugozum*, *A. picis* и *A. thiophilum* [2]. Также в 2009, 2011 годах были описаны еще два вида *Azospirillum* — *Azospirillum palatum* [3], *Azospirillum formosense* [4], которые на сегодняшний день еще не валидированы. Хотя представители рода в большинстве случаев локализованы в ризосфере, нами был обнаружен штамм BV-S<sup>T</sup>, в дальнейшем отнесенный к новому виду *A.*

*thiophilum*, который растет в водных сероводородных биотопах [5]. Данный изолят вызывает большой интерес в связи с предположением о его способности к литотрофному росту на основе изучения активности ферментов серного метаболизма (тиосульфатдегидрогеназы) и сопряженности процесса окисления серных соединений с функционированием ЭТЦ [5].

Целью данной работы являлось доказать способность к литотрофному росту у представителя рода *Azospirillum* — *Azospirillum thiophilum* с использованием молекулярно-генетического подхода.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Проверить наличие ряда генов, кодирующих ферменты серного метаболизма: *soxB* — компонент тиосульфатоокисляющего ферментного комплекса; *aprAB*, кодирующий диссимиляторную аденозин — 5' — фосфосульфатредуктазу; *rDsr*, кодирующий

© Лавриненко К. С., Фролов Е. Н., Тутукина М. Н., Юревич Л. И., Белоусова Е. В., Грабович М. Ю., 2011

диссимилиаторную сульфитредуктазу и *sqr*, кодирующий сульфид: хиноноксидоредуктазу.

2. Определить нуклеотидную последовательность фрагмента гена *soxB* и оценить уровень его гомологии с аналогичным геном других микроорганизмов.

3. Определить уровень экспрессии гена *soxB* в аэробных и микроаэробных условиях культивирования.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служил штамм *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup>, выделенный из серного мата умеренно-термального сульфидного источника, расположенного в северных отрогах Главного Кавказского хребта.

Для культивирования *Azospirillum thiophilum* *sp. nov.* штамма BV-S<sup>T</sup> использовали полужидкую среду PSS следующего состава: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 1,0 г/л, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O — 0,03 г/л, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 1,0 г/л, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O — 1 г/л, сукцинат натрия — 1,0 г/л, пептон — 2,0 г/л, дистиллированная вода — 1 л, набор витаминов и микроэлементов [6, 7]. Для создания микроаэробных условий бактерии культивировали во флаконах емкостью 0,5 л с прокладками из полибутиловой резины и завинчивающимися металлическими колпачками в 50 мл жидкой среды; содержание кислорода в газовой фазе составляло 2% [5].

Суммарную клеточную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции как описано в [8] с небольшими модификациями. Качественный анализ препаратов РНК проводили путем денатурирующего электрофореза — 4% ПААГ в присутствии 8М мочевины или же в 1% агарозном геле с добавлением формальдегида при напряженности электрического поля 7 В/см. Окрашивание гелей осуществляли с помощью бромистого этидия. Визуализацию результатов осуществляли на трансиллюминаторе в проходящем УФ-свете с длиной волны 254 нм.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas, Литва). Смесь РНК (2 мкг) с соответствующим праймером (4 пмоль) «плавляли» в течение 10 минут при 68 °С, добавляли реакционную смесь, содержащую буфер для ревертазы (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> и 50 mM DTT), dNTP (конечная концентрация в пробе — 0,2 mM), и ингибитор рибонуклеаз. Затем пробирки быстро охлаждали на льду, добавляли 40 ед. обратной транскриптазы MMuLV (Revert Aid™) и проводили реакцию при 42 °С в течение 40 минут.

Для инактивации фермента пробы прогревали 5 минут при 85 °С.

ПЦР в реальном времени проводили на приборе ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия) с использованием интеркалирующего в двухцепочечную ДНК красителя SYBR Green I (Invitrogen, США). Для амплификации кДНК использовали следующую программу:

— 94 °С, 1 минута (1 цикл) Предварительное плавление кДНК с праймерами

Далее 30—40 циклов по программе:

— 94 °С — 20 секунд (плавление кДНК);

— 48—60 °С — 23 секунды (отжиг праймеров);

— 72 °С — 50—60 секунд (синтез фрагмента

ДНК).

Температура отжига подбиралась индивидуально для каждой пары праймеров. В случае генов *aprA* и *aprB* была использована технология touch-down ПЦР, когда в течение первых 8—10 циклов температура отжига постепенно снижается от максимальной, приемлемой для данной пары (60 °С), на 5—6 градусов, а затем оставшиеся 30 циклов проводятся по стандартной программе. Этот подход был проверен на других видах сероокисляющих бактерий, и оказалось, что он позволяет существенно снизить процент неспецифического связывания вырожденных праймеров и повысить выход специфического продукта. Оценку флуоресцентного сигнала осуществляли в конце каждого цикла в течение 15 секунд. Эксперименты проводили на двух независимых препаратах РНК в трех статистических повторностях. Во всех случаях качество ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически в 5%-ом ПААГ (210В, 100мА). В качестве маркеров молекулярного веса использовали стандартный набор фрагментов ДНК (New England Biolabs, Quick-Load™ 100bp DNA Ladder). Для подтверждения соответствия полученных фрагментов искомой последовательности, они были секвенированы в ВНТК «Генной активности» ИБФМ РАН на автоматическом ДНК секвенаторе SEQ2000 XL (Beckman Coulter, США) в соответствии с предлагаемым фирмой протоколом. Первичный анализ сходства полученных нуклеотидных последовательностей генов проводили с помощью программ BLAST, ClustalW2 и TCoffee (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Количественный анализ уровня экспрессии генов проводили при помощи программы q\_PCR (ДНК-Технология). Относительное количество синтезированных ампликонов рассчитывали по формуле 2<sup>-ΔCt</sup>.

Праймеры, используемые в работе

Ген	Праймеры	Последовательность	Темп. отжига	Длина продукта
aprA и aprB	AprB1Fw- AprA 5RV	AprB-1-FW TGC GTG TAY ATH TGY CC 272—288 AprA-5-RV GCG CCA ACY GGR CCR TA 1615—1631	Touch-down 60—50	1266
aprA	AprA1Fw- 5RV	AprA-1-FW TGG CAG ATC ATG ATY MAY GG 1236—1256 AprA-5-RV GCG CCA ACY GGR CCR TA 1615—1631	Touch-down 60—50	396
soxB	soxB693F soxB1446B	soxB693F ATC GGN CAR GCN TTY CCN TA 693—713 soxB1446B CAT GTC NCC NCC RTG YTG 1446—1428	55	750—780
sqr	Sqr G3 199F-566R	Sqr-G3-199F TBT AYS AGC CGG GWC TKC TBT Sqr-G3-566R GGY GCM ACS GGG CAT TTG	55	310—367
	Sqr 145F-490R	Sqr-G2-145F TGG ACC CTG GTGGGC GSS GG Sqr-G2-490R TTC WKC GGC GCG CCS SCG CA	60	345

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Результаты ПЦР.** Для обнаружения генов *rDsr*, *sqr*, *aprAB* и *soxB* были использованы вырощенные праймеры (табл. 1), подобранные на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей. ПЦР-анализ показал отсутствие генов *rDsr*, *aprAB*, *sqr*, кодирующих обратную диссимиляторную сульфитредуктазу, диссимиляторную аденозин-5'-фосфосульфатредуктазу и сульфид: хиноноксидоредуктазу, соответственно.

Поиск генов *soxB* проводился с использованием четырех вырощенных праймеров: *432F*, *693F*, *1164B* и *1446B*. ПЦР анализ с различными комбинациями прямого и обратного праймеров показал следующее: использование пар *432F* — *1446B*, *432F* — *1164B* и *693F* — *1164B* давало большое количество продуктов реакции, причем все они по величине не соответствовали размеру ожидаемого продукта. С использованием пары праймеров *693F* — *1446B* был получен продукт ожидаемой величины ~780 п.о., а также небольшое количество неспецифического продукта, от которого в дальнейшем удалось избавиться благодаря оптимизации методики ПЦР (рис. 1).

**Результаты ПЦР в реальном времени.** Ранее было установлено, что основным фактором, определяющим тип метаболизма у *Azospirillum thioophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> в присутствии восстановленных соединений серы, является концентрация кислорода. В микроаэробных условиях по сравнению с аэробными в значительной степени происходит увеличение скорости окисления восстановленных соединений серы и интенсивности

дыхания на тиосульфате [5]. Поэтому для количественной оценки уровня экспрессии гена *soxB* в микроаэробных и аэробных условиях была проведена ОТ-ПЦР в реальном времени. Из рис. 2 видно, что в микроаэробных условиях по сравнению с аэробными происходит значительное увеличение продукта гена *soxB*. Для экспериментов были использованы три независимых выделения РНК, при этом с каждой кДНК проводилось по два эксперимента, с двумя концентрациями кДНК в ПЦР-

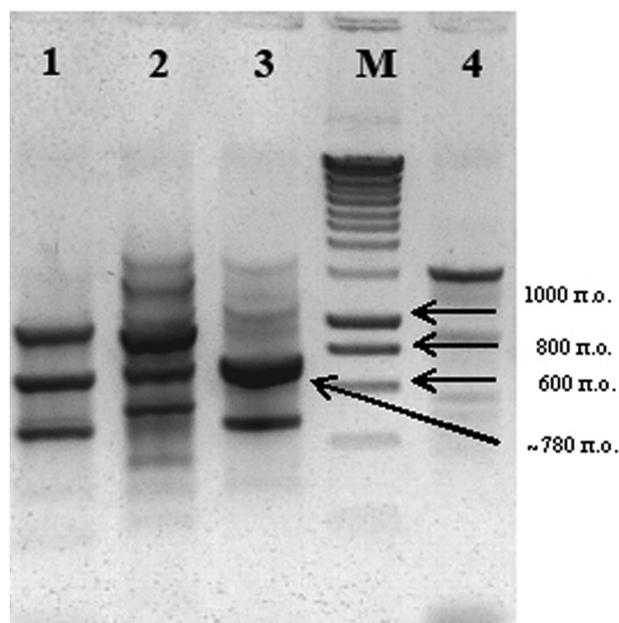


Рис. 1. Продукты ПЦР с использованием вырощенных праймеров к гену *soxB*. Комбинации праймеров: 1 — *432F*-*1446B*, 2 — *432F*-*1164B*, 3 — *693F*-*1446B*, 4 — *693F*-*1164B*

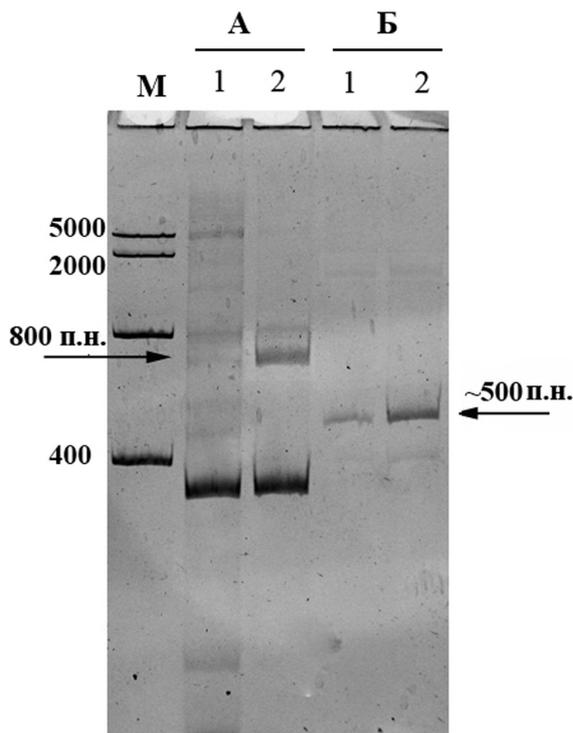


Рис. 2. Результаты ОТ-ПЦР для гена *soxB* с различными вариантами праймеров. М — маркеры длины нуклеотидных последовательностей; 1 — бактерии культивировали в аэробных условиях; 2 — бактерии культивировали в микроаэробных условиях. А — амплификация с праймерами 693F-1446B; Б — амплификация с праймерами 693F-1164B

пробе — 2 и 4 мкл. В результате было показано, что в микроаэробных условиях экспрессия гена *soxB* увеличивается в 6 раз (рис. 3).

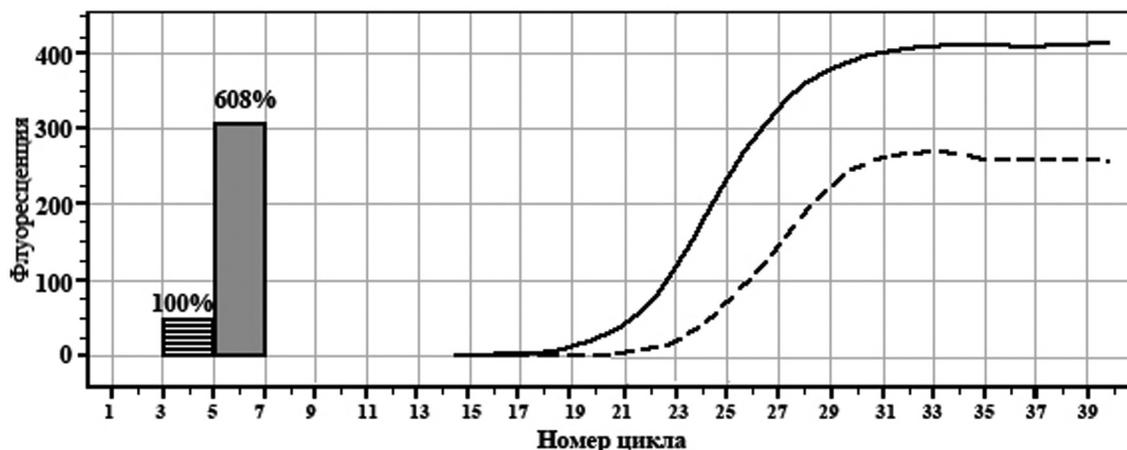


Рис. 3. Уровень экспрессии гена *soxB* при культивировании бактерий в микроаэробных (сплошная кривая) и аэробных условиях (пунктирная кривая). На графике показана зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла (типичный эксперимент) и среднее увеличение уровня экспрессии в микроаэробных условиях (по данным шести независимых экспериментов, столбец со сплошной заливкой) в процентном отношении к контролю (аэробные условия, столбец с прерывистой заливкой)

**Результаты секвенирования гена *soxB*.** Для того чтобы оценить уровень гомологии с аналогичными генами других видов бактерий, было проведено секвенирование участка гена *soxB* (JN015012), и полученная последовательность была использована для сравнительного анализа с использованием пакетов программ Blast, Toffee и ClustalW2. Установлено, что процент сходства генов *soxB* *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> с аналогичными генами других бактерий составляет 66—78%.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> — это первый представитель рода *Azospirillum*, способный к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы. Это утверждение основывалось на обнаружении высокой активности тиосульфатдегидрогеназы и SOX комплекса, сопряжения окисления восстановленных соединений серы с функционированием электронтранспортной цепи: в микроаэробных условиях в значительной степени происходит увеличение скорости окисления восстановленных соединений серы и наблюдается индукция дыхания на тиосульфате. Для убедительного доказательства способности *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> к литотрофному росту могли бы послужить данные по обнаружению соответствующих генов ферментов диссимиляционного серного метаболизма. С помощью методов молекулярной генетики было выявлено наличие гена *soxB*. Анализ нуклеотидной последовательности обнаруженного гена указывает на высокий уровень ее гомологии с аналогичным

геном других микроорганизмов. Данные по динамике экспрессии гена *soxV* в различных условиях роста подтвердили биохимические исследования, свидетельствующие, что основным фактором, определяющим тип метаболизма у *Azospirillum thiophilum* в присутствии восстановленных соединений серы, является концентрация кислорода. Местообитание, откуда выделен штамм BV-S<sup>T</sup>, характеризуется нерегулярным ритмом смены аэробно-микроаэробного режима в сероводородном источнике. Выявленная способность к быстрой смене типа энергетического метаболизма (переход от органотрофии к литотрофии), по-видимому, отражает адаптационные механизмы существования *Azospirillum thiophilum* в условиях переменного кислородного режима.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tarrand J. J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. / J. J. Tarrand, N. R. Krieg, J. Doebereiner // Can. J. Microbiol. — 1978. — Vol. 24. — P. 967—980.
  2. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring / K. Lavrinenko [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. — Vol. 60. — P. 2832—2837.
  3. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China / Y. Zhou [et al.] // J. Gen. Appl. Microbiol. — 2009. — Vol. 55. — P. 1—7.
  4. Shih-Yao Lin. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil / Shih-Yao Lin [et al.] // J. Syst. Evol. Microbiol. — 2011 (ijs.0.030585-0; published ahead of print July 8, 2011, doi:10.1099/ijs.0.030585-0).
  5. Особенности серного метаболизма и филогенетический анализ хроматограмм нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA у *Azospirillum thiophilum* sp. nov. / К.С. Лавриненко [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2009. — Т. 9. — С. 424—432.
  6. Caraway B. H. Aerotaxis in *Spirillum volutans* / B. H. Caraway, N. R. Krieg // Can J Microbiol. — 1974. — Vol. 20. — P. 1367—1377.
  7. Pfennig N. D. Uber das vitamin B<sub>12</sub> — bedurfuis phototropher Schwefelbakterien / N. D. Pfennig, K. D. Lippert // Arch. microbiol. — 1966. — Vol. 55, № 1. — P. 245—256.
  8. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal. Biochem. — 1987. — Vol. 162. — P. 156—159.
- 
- Лавриненко Ксения Сергеевна — аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 240-2040, e-mail: lavksen@mail.ru
- Фролов Евгений Николаевич — магистрант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (920) 410-5590, e-mail: evgenii\_frolov\_89@mail.ru
- Тутукина Мария Николаевна — научный сотрудник, Институт биофизики клетки РАН; тел.: (915) 212-7277, e-mail: masha306@rambler.ru
- Юревич Любовь Игоревна — аспирант, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН; тел.: (967) 097-7420, e-mail: lyubov\_yurevich@mail.ru
- Белоусова Елена Васильевна — ассистент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (920) 408-3758, e-mail: curly\_999@mail.ru
- Грабович Маргарита Юрьевна — профессор, д.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (905) 659-1525 e-mail: margarita\_grabov@mail.ru
- Lavrinenko Ksenia S. — graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (473) 240-2040, e-mail: lavksen@mail.ru
- Frolov Evgenii N. — student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (920) 410-5590, e-mail: evgenii\_frolov\_89@mail.ru
- Tutukina Mariy N. — research associate, Institute of Cell Biophysics; tel.: (915) 212-7277, e-mail: masha306@rambler.ru
- Yurevich Liubov I. — graduate student, G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms; tel.: (967) 097-7420, e-mail lyubov\_yurevich@mail.ru
- Belousova Elena V. — graduate student, Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (920) 408-3758, e-mail: curly\_999@mail.ru
- Grabovich Margarita Yu. — professor, Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (905) 659-1525, e-mail: margarita\_grabov@mail.ru