

УДК 579.25 579.262

ПОЛУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ ШТАММОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ДИКОРАСТУЩИХ БОБОВЫХ ДЛЯ ИХ ДЕТЕКЦИИ *in vivo* И *in vitro*

© 2011 г. Ан. Х. Баймиев*, Р. С. Ямиданов, Р. Т. Матниязов, Д. К. Благова,
Ал. Х. Баймиев, А. В. Чемерис

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, 450054

Поступила в редакцию 29.03.2011 г.

Принята к печати 28.04.2011 г.

Создана серия векторов экспрессии, содержащих гены флуоресцентных белков TurboGFP и TurboRFP под контролем конститутивного промотора фага T5, предназначенных для прижизненного окрашивания клубеньковых бактерий. Это векторы на основе репликона широкого круга хозяев pBBRI для маркирования штаммов, экспрессирующих маркерный ген с трансформируемой плазмиды, и векторы на основе плазмиды pRL765gfp для маркирования штаммов путем введения генов флуоресцентных белков в состав хромосомы бактерий. Показано, что для переноса конструкций в клетки клубеньковых бактерий наиболее предпочтительна трансформация, поскольку при наличии *mob*-участка в векторах, необходимых для конъюгативного переноса, возможна случайная мобилизация плазмиды и ее переход из клеток маркированных штаммов в другие почвенные бактерии. С применением созданных векторных конструкций получены флуоресцентно окрашенные штаммы *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Ensifer* (*Sinorhizobium*) sp., *Bradyrhizobium* sp., *Phyllobacterium* sp., *Agrobacterium* sp. и показана их пригодность для опытов *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, флуоресценция, GFP, RFP, плаزمида, трансформация.

OBTAINING OF FLUORESCENT-LABELED NODULE BACTERIA STRAINS OF WILD LEGUMES FOR THEIR DETECTION *in vivo* AND *in vitro*, by An. K. Baymiev*, R. S. Yamidanov, R. T. Matniyasov, D. K. Blagova, Al. K. Baymiev, A. V. Chemeris (Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia; *e-mail: mbb@anrb.ru). A series of expression vectors containing genes of fluorescent proteins TurboGFP and TurboRFP under the phage T5 constitutive promoter regulation, intended for lifetime marking of nodule bacteria is created: a series of vectors based on a broad-host-range replicon BBRI, for marking strains with an expression of reporter gene from a transformed plasmid and a series of vectors based on a plasmid pRL765gfp for marking strains by introduction genes of fluorescent proteins in a bacterial chromosome. It was shown that transformation is the most preferable method of constructions transfer in nodule bacteria cells, as in the presence of *mob* locus in the vectors necessary for conjugation, exists the possibility of occasional plasmid mobilization and its transition from marked strain cells in other soil bacteria. With application of the created vector constructions we obtained fluorescent tagged strains of *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Ensifer* (*Sinorhizobium*) sp., *Bradyrhizobium* sp., *Phyllobacterium* sp., *Agrobacterium* sp. Also their suitability for experiments *in vivo* and *in vitro* is shown.

Keywords: nodule bacteria, fluorescence, GFP, RFP, plasmid, transformation.

Клубеньковые бактерии – ризобии, граммотрицательные симбиотические почвенные микроорганизмы, имеют огромное значение для сельского хозяйства, поскольку они способны вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, которые по хозяйственной значимости занимают второе место после злаковых. Урожайность бобовых в большинстве случаев зависит от эффективности симбиотических взаимоотноше-

ний, связанной с микробиологической составляющей. Важное значение имеет и изучение ризобий дикорастущих бобовых, поскольку именно у них наблюдается наибольшее разнообразие клубеньковых бактерий. Изучение ризобий дикорастущих бобовых необходимо, с одной стороны, для полного понимания закономерностей азотфиксирующего симбиоза, а с другой, позволит получить материал для селекции эффективных ризобий, применяемых при выращивании бобовых растений.

* Эл. почта: baymiev@anrb.ru

При изучении клубеньковых бактерий часто возникает необходимость отслеживать их клетки в ходе взаимодействия с растениями, оценивать их выживаемость, конкурентоспособность и т.д. С этой целью нами были сконструированы и модифицированы наборы векторов, предназначенных для прижизненного маркирования клубеньковых бактерий с учетом некоторых особенностей этих микроорганизмов.

Существуют различные методы маркирования бактерий, основанные на привнесении в геном клеток исследуемого штамма генов белков, которые можно детектировать тем или иным способом. Клетки бактерий, несущие гены *lacZ*, *gusA*, *celA*, *luc* и *luxAB*, в присутствии соответствующего субстрата можно обнаружить по окрашиванию или люминесценции колоний [1–3], но необходимость использования дорогостоящих субстратов ограничивает применение этих методов в экспериментах с большим количеством образцов [4].

В настоящее время наиболее удобными и эффективными прижизненными маркерами считаются гены флуоресцентных белков. Впервые ген белка, флуоресцирующего в зеленом диапазоне при освещении его синим светом, обнаружили у медузы *Aequorea victoria* [5]. Сейчас известно несколько десятков природных и модифицированных генов, белковые продукты которых флуоресцируют во всех участках видимого спектра, от синего-зеленого до рубиново-красного. Но чаще всего применяются гены зеленого и красного флуоресцентных белков – GFP и RFP соответственно.

Существуют два основных способа маркирования бактериальных клеток – экспрессия гена флуоресцентного белка в составе плазмиды и встраивание маркерного гена в хромосому при помощи транспозона, обычно Tn5. Оба варианта имеют свои преимущества и недостатки. Преимущество хромосомной экспрессии – стабильность, к недостаткам относятся однокопийность встраиваемого гена, невысокий уровень продукции целевого белка, а также случайность встраивания в геном, что может привести к мутациям, изменяющим характеристики изучаемого штамма. Плазмидная экспрессия лишена подобных недостатков, но не исключена вероятность случайной элиминации введенной конструкции в отсутствие селективного маркера, что приводит к нестабильному маркированию клеток. В связи с этим при работе с ризобиями необходимо иметь определенный набор флуоресцентно маркирующих векторов, предназначенных для решения различных экспериментальных задач.

При изучении клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых растений приходится иметь дело с большим разнообразием штаммов, принадлежащих в основном к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobi-*

um, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Agrobacterium*. Следует отметить, что разные штаммы одного вида часто отличаются составом плазмид, которые вносят существенный вклад в их фенотипические характеристики. Наличие удобного инструмента для прижизненного флуоресцентного окрашивания бактерий в разные цвета открывает новые возможности для изучения взаимодействия микросимбионтов с растениями и с другими микроорганизмами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и среды. В работе использовали штаммы клубеньковых бактерий, принадлежащих к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Agrobacterium*, выделенные из клубеньков дикорастущих бобовых растений умеренных широт с целью их мечения флуоресцентными белками, а также штамм XL1-Blue *Escherichia coli* для генно-инженерных манипуляций.

Клубеньковые бактерии культивировали на среде JM (1% маннит, 0.05% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4$, 0.01% NaCl, 0.1% дрожжевой экстракт) при 28°C. *E. coli* выращивали на среде LB (1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl) при температуре 37°C. В качестве селективных антибиотиков при трансформации использовали ампициллин (100 мг/мл), канамицин (50 мг/мл) и гентамицин (50 мг/мл).

Конструирование векторов. В работе использовали гены флуоресцентных белков TurboGFP (максимум возбуждения/испускания – 482/502 нм) – улучшенный вариант белка CopGFP из копеподы *Pontellina plumata* [6], и TurboRFP (максимум возбуждения/испускания – 553/574 нм) – красный флуоресцентный белок из анемоны *Entacmaea quadricolor* [7]. Источниками генов этих белков послужили коммерческие векторы pTurboGFP-B и pTurboRFP-B (“Evrogen”, Россия).

В качестве основы для создания плазмиды, несущей ген флуоресцентного белка, использовали плазмиду широкого круга хозяев pJN105 с репликоном BBRI [8]. Из этого вектора по сайтам рестрикции XhoI и NheI удалили экспрессионную кассету, регулируемую *araC-P_{BAD}*, и вместо нее встроили гены *TurboGFP* и *TurboRFP* под контролем промотора фага T5 с *Lac*-оператором, вырезанные из векторов pTurboGFP-B и pTurboRFP-B по тем же сайтам рестрикции.

Инактивация *Lac*-оператора и делеция *mob*-участка осуществлены методом сайт-направленного мутагенеза с применением инвертированной ПЦР, согласно [9]. *Lac*-оператор удаляли с использованием праймеров Lac1 – 5'-AATTTCA-CACAGAATTGATT-3' и Lac2 – 5'-AATTGAATC-TATTATAATTG-3'. Для удаления *mob*-участка –

Mob1 – 5'-CGCAAGAAGGCCGATCAAG-3' и Mob2 – 5'-AGCCCGTGGATATGTGGAC-3'.

Для маркирования бактерий путем встраивания гена флуоресцентного белка в состав хромосомы плазмиды pRL765gfp была модифицирована путем замещения гена *gfp*, регулируемого промотором *psbA*, геном *TurboGFP* или *TurboRFP*, регулируемым конститутивным промотором фага T5. С этой целью участок ДНК, содержащий ген *gfp* с промоторным участком, вырезали по сайтам рестрикции BamHI и XbaI. Образовавшиеся липкие концы вектора “полировали” T4-ДНК-полимеразой. Для предотвращения замыкания вектора в кольцо при лигировании 5'-фосфатные остатки удаляли с помощью щелочной фосфатазы (“Promega”) согласно инструкции фирмы. Фрагменты ДНК, содержащие гены *TurboGFP* или *TurboRFP* под промотором T5, вырезали из векторов pTurboGFP-B и pTurboRFP-B по сайтам рестрикции XhoI и NheI, и после “полировки” концевых участков T4-ДНК-полимеразой лигировали с полученным вектором.

Клетки трансформировали векторными конструкциями с использованием электропорации на приборе MicroPulser (“BioRad”), предустановленной программы и протокола для трансформации агробактерий в 0.1 см электропорационной кювете. Электрокомпетентные клетки готовили согласно [10].

Меченые бактерии наблюдали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager M1 (“Carl Zeiss”, Германия). Для детекции GFP использовали набор светофильтров №10 (полоса возбуждения BP 450–490, испускания BP 515–565), для детекции RFP – набор светофильтров №15 (возбуждение BP 546/12, испускание LP 590).

Подсчет количества потерявших маркерную плазмиду клеток в условиях, близких к естественным, проводили методом визуального анализа бактерий на агаризованной среде. Корни инокулированных меченым штаммом растений, выращенных в стерильных условиях на песке, отмывали жидкой питательной средой JM. Полученный смыв высевали на чашки с агаризованной средой JM. Колонии клеток без маркерной плазмиды выявляли по отсутствию флуоресценции.

Мобилизацию маркерных плазмид и их переход в другие клетки определяли следующим образом. Штаммы клубеньковых бактерий трансформировали векторами, несущими гены разных флуоресцентных белков, и выращивали вместе в течение 2 недель на твердой и жидкой питательных средах при температуре 28°C. При выращивании на жидкой питательной среде колбы с культурами в течение 2 сут встряхивали на термостатируемом шейкере со скоростью 200 об/мин, а при дальнейшем выращивании – 20 об/мин. Долю клеток клубеньковых бактерий, содержащих

только GFP, только RFP, либо оба маркирующих белка одновременно, определяли на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (“Beckman Coulter”). С этой целью клетки дважды промывали, а затем суспендировали в 500 мкл фосфатного буфера. Популяцию клеток разделяли по параметром прямого (FS) и бокового (SS) светорассеивания. Флуоресценцию регистрировали на канале FL1 (505–545 нм) для детекции GFP и на канале FL3 (605–635 нм) для RFP. Параметры напряжения и компенсации выставляли по контрольным немеченым, меченым GFP и меченым RFP клеткам *E. coli*. Данные обрабатывали в программе FCS Express 3.00.0007 (“De Novo Software”, США). Процентное соотношение популяций клеток представляли в виде четырех квадрантов (FL1 против FL3). За 100% принимали количество флуоресцентных событий в трех последних квадрантах. Проводили по три независимых опыта для каждого вида трансформации.

Плазмидный профиль микроорганизмов анализировали согласно [11]. Плазмиды разделяли в 0.8%-м агарозном геле с использованием инвертора тока PPI-200 (“MJ Research”) при напряженности 3–4 В/см геля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью визуального изучения взаимодействия клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых с растениями и другими микроорганизмами в различных экспериментальных условиях с использованием разных маркерных векторов нами получены штаммы клубеньковых бактерий, меченные флуоресцентными белками. Способ маркирования выбирали в зависимости от поставленных целей.

Мы получили наборы векторов, каждый из которых включал два вектора, различающихся генами флуоресцентных белков. При создании векторных конструкций использовали гены белков серии Turbo: группы TurboGFP и TurboRFP, улучшенные по сравнению с первыми вариантами подобных белков, применяемых для мечения живых клеток [6, 7]. Первый набор векторов – pJNTurboGFP и pJNTurboRFP, создан для экспрессии маркерного гена в составе плазмиды. Необходимость в таких векторах продиктована тем, что подобная система минимально влияет на фенотипические характеристики исследуемых штаммов, поскольку не приводит к мутациям генома клеток-хозяев. Множественная копияность трансформируемой плазмиды повышает скорость накопления маркерного белка и интенсивность его флуоресценции. В качестве основы для конструкций использовали плазмиду широкого круга хозяев pJN105 – производную плазмиды pBBR1, выделенной из штамма S87 *Bordetella bronchiseptica* [12, 13]. Уникальность репликона этой плазмиды

ды заключается в том, что он не принадлежит ни к одной из известных групп несовместимости, т.е. вектор с данным репликоном не должен конфликтовать ни с одной из известных плазмид [12, 14]. Данное свойство – необходимое условие для мечения бактериальной клетки флуоресцентным белком, ген которого экспрессируется с плазмиды, поскольку конфликт непременно приведет к элиминации или вносимой векторной конструкции, или хозяйской плазмиды, что, в свою очередь, может изменить фенотип микроорганизма. Это особенно важно в случае клубеньковых бактерий, значительную часть генома которых составляют именно плазмиды. Кроме того, гены, определяющие симбиотические свойства *Rhizobium* sp. и *Ensifer (Sinorhizobium)* sp., имеют плазмидную локализацию, и их потеря приводит к утрате данных свойств. Для проверки возможного конфликта маркерных конструкций с хозяйскими плазмидами штамм ВКBLV11 *R. leguminosarum*, у которого ранее обнаружили 15 различных плазмид, трансформировали вектором рJNTurboRFP. Плазмидный профиль, определенный до и после трансформации клеток этого штамма, не выявил потери какой-либо из имевшихся плазмид, что в какой-то мере может свидетельствовать об отсутствии конфликта между внесенной конструкцией и имеющимися в клетке плазмидами (рис. 1).

При исследовании клубеньковых бактерий наиболее удобно использовать конститутивно экспрессируемые маркерные гены, поскольку добавление индуктора в почву не всегда возможно, особенно при испытании штаммов в природных условиях. Поэтому для конститутивной экспрессии генов флуоресцентных белков *Lac*-оператор, под регуляцией которого данные гены находились в рTurboGFP-В и рTurboRFP-В, во вновь созданных конструкциях был нарушен методом сайт-направленного мутагенеза.

Выявлена относительно высокая частота трансформации методом электропорации клубеньковых бактерий полученными векторами (таблица). Это обстоятельство дает возможность не применять метод конъюгации при переносе конструкции в клетки исследуемого штамма и делает *mob*-участок в составе маркерных плазмид необязательным.

Поскольку созданные конструкции изначально содержали *mob*-участок плазмиды рВВR1 и были способны к мобилизации в присутствии конъюгативных плазмид IncP, не исключалась возможность спонтанной передачи экспрессирующего вектора природным штаммам, что при проведении опытов в природных условиях могло привести к ошибочным результатам.

При проверке данной возможности действительно обнаружили переход *mob*-содержащих мар-

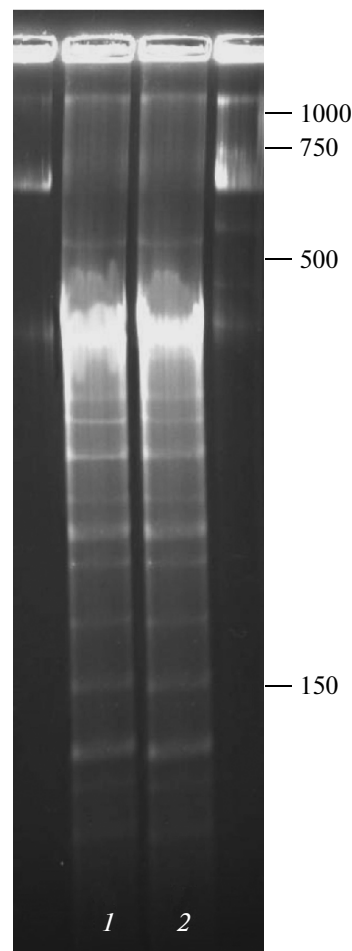


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидных профилей штамма ВКBLV11 *R. leguminosarum* до (1) и после (2) трансформации его маркирующим вектором рJNTurboRFP. Электрофорез инвертированным током в 0.7%-м агарозном геле с эффективным разделением в границах от 17 до 2200 т.п.н. Размерность представлена в 1000 п.н.

кирующих плазмид между некоторыми штаммами клубеньковых бактерий. В частности, такой перенос обнаружен между штаммами ВКBLV16.17 *R. leguminosarum*, трансформированным рJNTurboGFP, и штаммом ВКBLPu14 *Agrobacterium* sp., трансформированным рJNTurboRFP, что приводило к образованию клеток, содержащих как красный, так и зеленый флуоресцентные белки (рис. 2). По-видимому, один из испытываемых штаммов содержал плазмиду, способную к мобилизации данных конструкций.

Поэтому для изучения ассоциативных взаимодействий с растениями, конкурентоспособности и эффективности образования клубеньков в природных условиях из плазмид удалили *mob*-участки, чтобы предотвратить спонтанную передачу вектора природным штаммам. Такие конструк-

Эффективность трансформации электропорацией клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых растений плазмидой pJNTurboRFP

Клубеньковая бактерия	Растение-макросимбионт	Штамм	Эффективность трансформации*
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Lathyrus vernus</i>	ВКBLV5	5.1×10^4
	<i>Caragana fletux</i>	ВКBCF31	3.7×10^4
	<i>Genista tinctoria</i>	ВКBGT16	6.2×10^4
<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>L. palustris</i>	ВКBLPu14	8.8×10^4
	<i>L. palustris</i>	ВКBLPu7	7.1×10^4
<i>Ensifer</i> sp.	<i>Astragalus wolgensis</i>	ВКBAV1	2.1×10^2
	<i>A. wolgensis</i>	ВКBAV4	4.3×10^2
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>C. fletux</i>	ВКBCF21	41
	<i>Chamaecytisus ruthenicus</i>	C1	52
<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>A. danicus</i>	2-1	7.4×10^3
	<i>Hedysarum grandiflorum</i>	13-2	6.7×10^3
<i>Phyllobacterium</i> sp.	<i>Genista tinctoria</i>	ВКBGT13	1.1×10^3
	<i>Chamaecytisus ruthenicus</i>	C2B	2.4×10^3
	<i>C. fletux</i>	ВКBCF5	1.8×10^3

* Эффективность рассчитана по количеству клеток, трансформированных 1 мкг плазмидной ДНК.

ции назвали *mob*-: pJNTurboGFP*mob*- и pJNTurboRFP*mob*- (рис. 3).

С использованием векторов данной серии удалось получить маркированные штаммы разных родов клубеньковых бактерий: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Agrobacterium*. Экспрессирующий вектор имеет многочисленные преимущества для мечения бактерий флуоресцентными белками, однако, основной его недостаток состоит в возможности случайной элиминации при отсутствии воздействия селектирующего маркера. Это обстоятельство накладывает определенные ограничения на его использование. Так, было об-

наружено, что при инокуляции штаммами, маркированными RFP, после выращивания растений на песке в течение 30 дней плазмиду pJNTurboRFP теряют от 15 (*Rhizobium*) до 30% (*Bradyrhizobium*) клеток. Хотя плазмиды с репликоном BBRI относительно стабильны в отсутствие селективного маркера [12, 13, 15, 16], однако для продолжительных опытов необходимо более стабильное маркирование, которое может быть достигнуто встраиванием маркерного гена в состав хромосомы.

Для создания такой системы была модифицирована плаزمида pRL765gfp [17]. Ген *gfp*, регулируемый промотором *psbA*, находящийся в составе

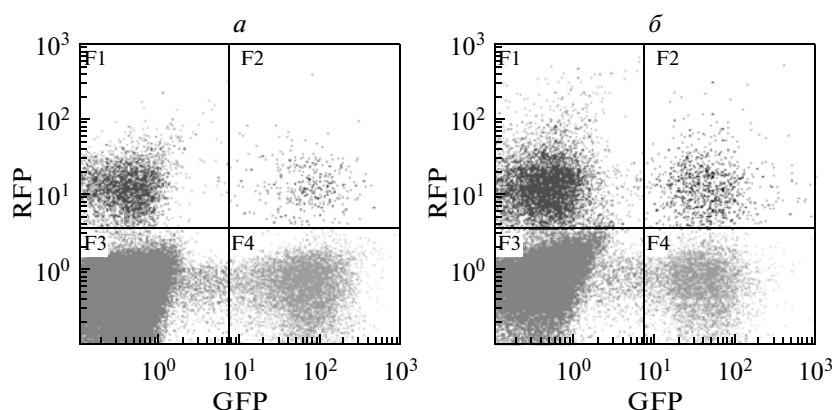


Рис. 2. Разделение популяций клеток ризобий методом проточной цитометрии. Нижний левый квадрант F3 – дебрис, мертвые нефлуоресцирующие клетки; верхний левый квадрант F1 – клетки штамма ВКBLPu14 *Agrobacterium* sp., содержащие RFP; нижний правый квадрант F4 – клетки штамма ВКBLV16.17 *R. leguminosarum*, содержащие GFP; верхний правый квадрант F2 – пул клеток, содержащий оба маркирующих белка. Клетки, выращенные на жидкой (а) и твердой (б) питательной среде.

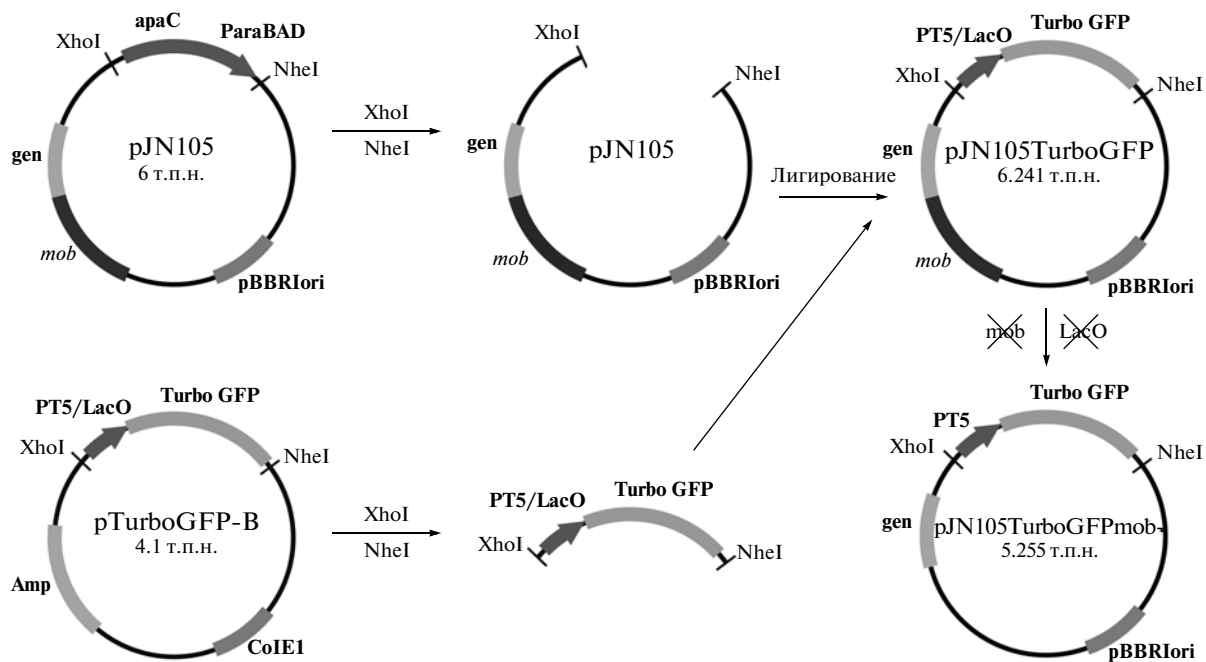


Рис. 3. Схема получения экспрессирующей векторной конструкции с репликоном широкого круга хозяев BBRI, содержащей ген *TurboGFP* под регуляцией промотора фага T5.

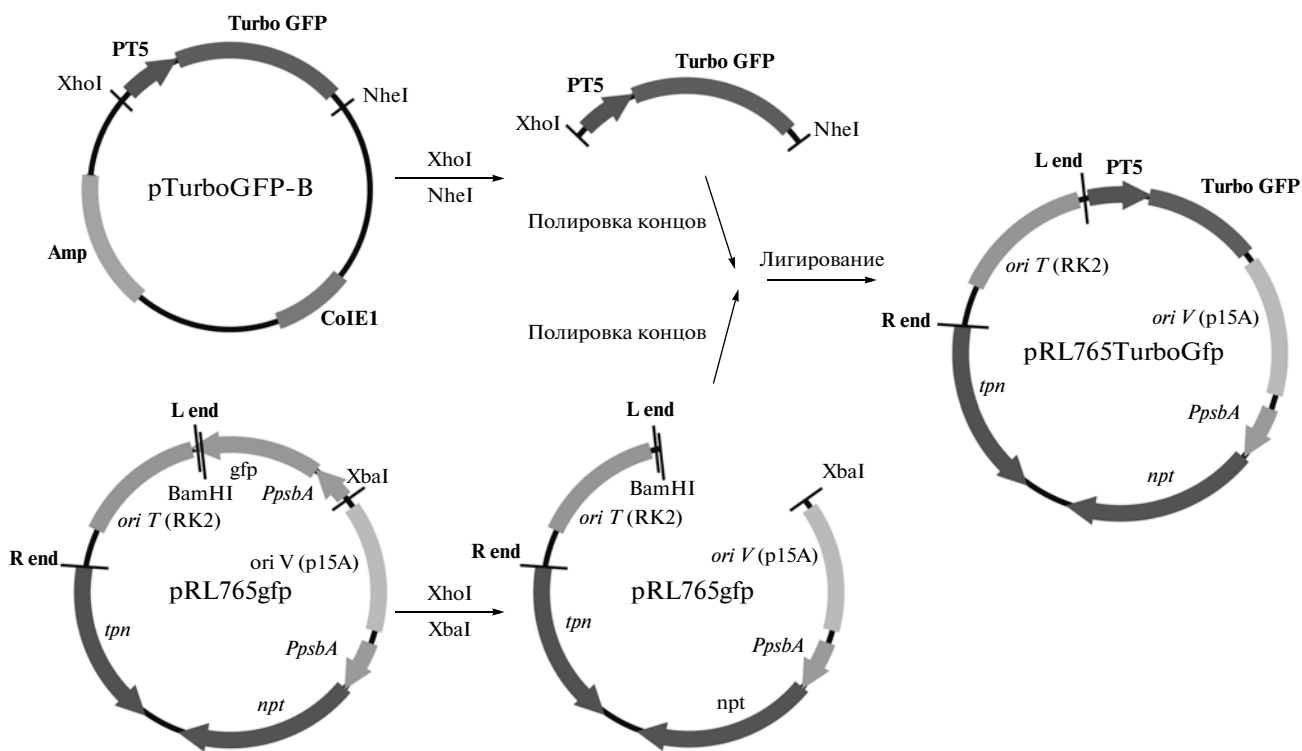


Рис. 4. Схема модификации плазмиды pRL765gfp путем замены гена *gfp* под регуляцией промотора *psbA* на ген *TurboGFP* под регуляцией промотора фага T5.

транспозона Tn5, заменили генами флуоресцентных белков группы TurboColors, контролируемые конститутивным промотором фага T5. Такие

плазмиды обозначены как pRL765TurboGFP и pRL765TurboRFP (рис. 4). Необходимость в модификации pRL765gfp обусловлена тем, что при

мечении штаммов клубеньковых бактерий при помощи данного вектора не удалось получить флуоресцентно меченные штаммы, уверенно выявляемые при помощи флуоресцентного микроскопа. Скорее всего, это вызвано тем, что pRL765gfp содержит ген мутантного белка GFP (P11) из медузы *Aequorea victoria*, уступающего по интенсивности эмиссии и полупериоду рефолдинга флуоресцентным белкам группы TurboColors.

Проведенная модификация заметно улучшила флуоресцентные характеристики меченых с использованием данных конструкций штаммов. Но, к сожалению, как и в случае pRL765gfp, при использовании pRL765TurboGFP и pRL765TurboRFP возникают проблемы с эффективностью трансформации. Так, например, при помощи данных конструкций нами получены маркированные штаммы *Rhizobium* sp., *Phyllobacterium* sp., *Agrobacterium* sp., но эффективность трансформации не превышала 1–5 колоний на 1 мкг трансформируемой ДНК. Трансформация же штаммов *Mesorhizobium* sp., *Ensifer* sp., *Bradyrhizobium* sp. вообще не увенчалась успехом. Во всех случаях использовали метод электропорации.

К недостаткам такого подхода относится и случайное встраивание маркерного гена, что может привести к появлению мутаций и определенным фенотипическим изменениям, т.е. уже нельзя будет говорить о тождественности штаммов до и после трансформации. Маркированные таким образом бактерии необходимо рассматривать уже как отдельные штаммы. К безусловному же преимуществу этого подхода относится стабильность маркирования. После инокуляции штаммом BKBLV5 *R. leguminosarum*, маркированным pRL765TurboRFP, и выращивания растений гороха на песке в течение 30 дней флуоресцентную метку теряло не более 1% бактериальных клеток.

В заключение необходимо отметить, что у каждого способа маркирования клубеньковых бактерий флуоресцентными белками есть свои преимущества и недостатки. В кратковременных опытах по изучению свойств микроорганизмов, механизмов взаимодействия, конкурентоспособности и т.д., основное требование в которых, неизменность фенотипа исследуемого штамма, более применима плазмидная экспрессия маркерного гена. В случае длительных экспериментов, где более важно устойчивое маркирование, желательно встраивание маркерного гена в состав хромосомы. Применяемые в работе гены флуоресцентных белков серии Turbo несмотря на то, что кодоны в них оптимизированы для лучшей экспрессии в животных клетках, показали стабильную высокую экспрессию и в клубеньковых бактериях, а синтезируемые белки обладали отличными маркерными свойствами. Необходимо

также учитывать, что у почвенных микроорганизмов, в том числе и у клубеньковых бактерий, сильно развит горизонтальный перенос генов, особенно путем конъюгации, что вносит свои коррективы при создании экспрессирующих векторов для маркирования клеток.

Авторы выражают глубокую благодарность J.K. Jansson за предоставленную плазмиду pRL765gfp и “NBRP-E.coli at NIG” (Япония) за плазмиду pJN105.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (госконтракт 02.518.11.7138) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (Госконтракт № 16.740.11.0671).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Streit W., Kosh K., Werner D. 1992. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (*gus*) gene fusion. *Biol. Fertility Soil.* **14**, 140–144.
2. Wilson K.J., Sessitsch A., Akkermans A.D.L. 1994. Molecular markers as tools to study the ecology of microorganisms. In: *Beyond the biomass, compositional and functional analysis of soil microbial communities*. Eds Ritz K., Dighton J., Giller K.E., UK: Wiley-Sayce Publ., 149–156.
3. Sessitsch A., Hardarson G., de Vos W.M., Wilson K.J. 1998. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. *Plant Soil.* **204**, 35–45.
4. Bhatia R., Dogra R.C., Sharma P.K. 2002. Construction of green fluorescent protein (GFP)-marked strains of *Bradyrhizobium* for ecological studies. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 835–839.
5. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**, 802–805.
6. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. 2004. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 841–850.
7. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W., Chudakov D.M. 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods.* **4**, 555–557.
8. Newman J.R., Fuqua C. 1999. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene.* **227**, 197–203.
9. Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.И., Баймиев Ан.Х., Чемерис А.В. 2007. Сайт-направленный мутагенез

- углеводсвязывающих участков лектинов бобовых растений с использованием инвертированной ПЦР. *Молекуляр. биология*. **41**, 940–942.
10. Lin J.-J. Electrotransformation of *Agrobacterium*. 1995. In: *Methods in molecular biology*. Ed. Nickoloff J.A. Totowa: Humana Press, 171–178.
 11. Eckhardt T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*. **1**, 584–588.
 12. Antoine R., Locht C. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* **6**, 1785–1799.
 13. Elzer P.H., Kovach M.E., Phillips R.W., Robertson G.T., Peterson K.M., Roop R.M. 1995. *In vivo* and *in vitro* stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species. *Plasmid*. **33**, 51–57.
 14. Lefebvre M.D., Valvano M.A. 2002. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5956–5964.
 15. Karsi A., Menanteau-Ledouble S., Lawrence M.L. 2006. Development of bioluminescent *Edwardsiella ictaluri* for noninvasive disease monitoring. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**, 216–223.
 16. Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., Robertson G.T., Farris M.A., Roop 2nd R.M., Peterson K.M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. **166**, 175–176.
 17. Tombolini R., Unge A., Davey M.E., de Bruijn F.J., Jansson J.K. 1997. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**, 17–28.