

УДК 575.13:579.873.7

В.В. Лук'ячук

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ СТРЕПТОМІЦЕТНОЇ ПЛАЗМІДИ pSS181*

Проведено рестрикційний аналіз стрептоміцетної плазмиди pSS181 за допомогою 7 ендонуклеаз. Встановлено наявність сайтів рестрикції для ендонуклеаз EcoRI, PstI, BamHI, SalGI і BglI. На плазміді pSS181 є унікальний сайт для рестриктази EcoRI і відсутні сайти для HindIII та XbaI. Молекулярний розмір плазмиди pSS181 становить $10,75 \pm 0,25$ тпн.

В результаті гідролізу плазмидної ДНК парами ендонуклеаз (EcoRI + PstI) та (EcoRI + BamHI) виявлено, що сайт рестрикції для фермента EcoRI знаходиться на більших PstI та BamHI-фрагментах.

Ключові слова: стрептоміцет, плазміда, рестриктаза.

За даними літератури, клітини більшості мікроорганізмів містять позахромосомну плазмидну ДНК, яка може надавати клітині-господарю властивостей, що забезпечують її виживання в несприятливих умовах чи можливість засвоювати нове джерело енергії та вуглецю [4, 12, 15].

Відомо, що до 25 % досліджених культур стрептоміцетів мають плазмідні ДНК [6].

Метою даної роботи було дослідження нової стрептоміцетної плазмиди pSS181, як можливої основи для конструювання векторної молекули.

© В.В. Лук'ячук, 2009

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штам *Streptomyces* sp. 181, виділений у 2006 р. із зразка екологічно чистого ґрунту заказника “Долина Нарцисів” в Закарпатській області України.

В експериментах використовували рідке середовище S [13] та агаризоване соєве середовище [1].

Плазмідну ДНК з дводобового міцелію стрептоміцета виділяли за методом Кайзера [8]. Рестрикційний аналіз плазмідних ДНК проводили як запропоновано Маніатісом [3]. В роботі використовували рестриктази і стандартні буфери для рестрикції фірми «Ферментас» [2]. Електрофорез плазмідної ДНК та її фрагментів проводили в 0,8 % агарозі в ТБЕ-буфері [3]. Як стандарт молекулярних розмірів фрагментів плазмідної ДНК використовували HindIII-фрагменти ДНК фагу лямбда [2].

Результати та їх обговорення. З літературних джерел відомо, що завдяки наявності носія позахромосомної спадковості клітина стрептоміцета може отримати здатність продукувати ряд біологічно активних речовин, таких як антибіотики, пігменти та амінокислоти, набути стійкість до антибіотичних речовин та ряд інших властивостей [6, 12, 15]. Штам *Streptomyces* sp. 181 є культурою мікроорганізму, яка щойно виділена з навколишнього середовища. В даний час вивчаються генотипові та фенотипові ознаки даного мікроорганізму. Попередньо встановлено, що досліджуваний штам стрептоміцета продукує речовини, що мають антибіотичні властивості та водорозчинний пігмент фіолетового кольору.

У даного штаму стрептоміцета була виявлена плазмідна рSS181. Першим етапом дослідження плазмідної ДНК є проведення рестрикційного аналізу – це необхідно для встановлення її молекулярного розміру та побудови рестрикційної карти. При проведенні рестрикційного аналізу плазмідної рSS181 використано 7 ендонуклеаз рестрикції II типу (табл. 1, рис. 1). Встановлено, що плазмідна рSS181 має унікальний сайт рестрикції для рестриктази EcoRI і відсутні сайти рестрикції для 2 ферментів рестрикції HindIII і XbaI.

Наявність на плазміді ще двох чи трьох сайтів рестрикції відповідно для ендонуклеаз PstI та BamHI робить можливим проведення рестрикційного аналізу з використанням двох ферментів одночасно. Так, при гідролізі парами рестриктаз EcoRI + PstI та EcoRI + BamHI виявлено, що сайт рестрикції для фермента EcoRI знаходиться на більших PstI та BamHI-фрагментах (табл. 1).

Таблиця 1

Рестрикційний аналіз плазмідної рSS181

Використані ендонуклеази	Кількість фрагментів та їх молекулярні розміри	Сума фрагментів, тпн
EcoRI	1 (11,0 тпн)	11,0
PstI	2 (8,5 тпн, 2,2 тпн)	10,7
BamHI	2 (9,4 тпн, 1,4 тпн)	10,8
HindIII	0	
XbaI	0	
BglI	9 (2,0 тпн, 1,9 тпн, 1,4 тпн, 1,3 тпн, 0,9 тпн, 0,75 тпн, 0,65 тпн, 0,55 тпн, 0,4 тпн, 0,35 тпн, 0,3 тпн)	10,5
SalGI	9 (3,5 тпн, 2,1 тпн, 1,45 тпн, 1,0 тпн, 0,9 тпн, 0,7 тпн, 0,55 тпн, 0,4 тпн, 0,3 тпн)	10,9
<i>EcoRI + PstI</i>	3 (7,2 тпн, 2,2 тпн, 1,4 тпн)	10,8
<i>EcoRI + BamHI</i>	3 (6,0 тпн, 3,6 тпн, 1,4 тпн)	11,0
Середній розмір плазмідної рSS181	10,75±0,25	

Наявність унікального сайту рестрикції на плазміді рSS181 робить можливим використання її як базову молекулу при конструюванні вектору клонування для стрептоміцетів [3, 6, 15].

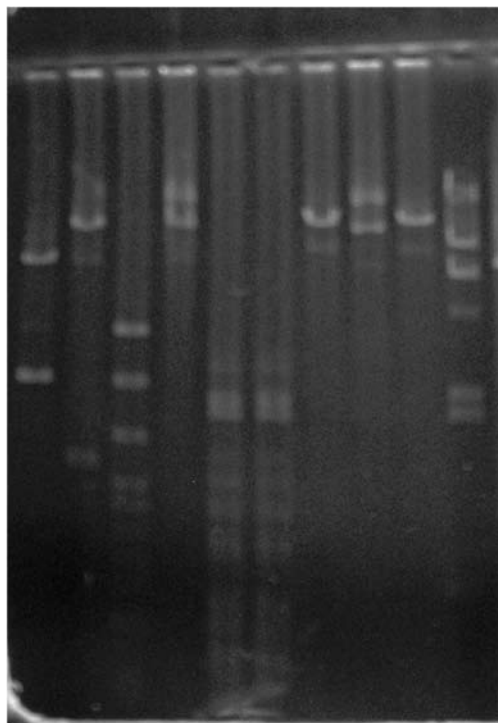


Рис 1. Електрофоретичне розподілення фрагментів плазмиди pSS181 після гідролізу ендонуклеазами: PstI (1); BamHI (2); SalGI (3); XbaI (4); BglII (5, 6); EcoRI (7); HindIII (8); EcoRI+ HindIII (9); λ + HindIII (10)

Як відомо з літературних джерел, плазмідна ДНК знайдена у кожного четвертого дослідженого стрептоміцета [6]. Молекулярний розмір плазмід становить від 1,8 тпн до 200 тпн, однак, більшість досліджених плазмід мають молекулярний розмір до 40 тпн [15]. Плазміди такого розміру використовуються як базисні молекули при конструюванні векторів: наприклад, SLP1.2 (14,5 тпн), pIJ101 (8,9 тпн), SCP2 (31,6 тпн), pSK2 (10,3 тпн), pVE1 (10,8 тпн), pJV1 (10,8 тпн) та інші [6]. Повідомляється про наявність кількох плазмідних ДНК, які мають молекулярний розмір у діапазоні $10,8 \pm 0,3$ тпн: pSAM2 – 11,1 тпн, pVE1–10,8 тпн, pSN22 – 11,0 тпн, pSLG3 – 10,9 тпн, pIJ109 – 10,8 тпн та pMG110 – 10,5 тпн [4, 7, 9, 11, 14, 16]. Ці плазміди виділені з штамів різних видів стрептоміцетів – *S. ambofaciens* ATCC 15154 (pSAM2), *S. venezuelae* ATCC 14585 (pVE1), *S. nigrifaciens* SN22 (pSN22), *S. lavendulae-grasserius* RIA746 (pSLG3), *S. phaeochromogenes* NRRI B 3559 (pIJ109) та *S. luteolutescens* IMEI 40341 (pMG110) тпн [4, 7, 9, 11, 14, 16]. В клітинах штаму *S. kasugaensis* ІМС MB273, як виявлено, одночасно існують 2 плазміди pSK1 та pSK2, що мають однаковий молекулярний розмір – 10,3 тпн та встановлено, що

вони мають різну первинну будову [6, 17].

Як встановлено, молекулярний розмір виявленої нами плазмиди pSS181 становить $10,75 \pm 0,25$ тпн. Порівняння результатів рестрикційного аналізу плазмиди pSS181 та рестрикційних карт плазмід близьких за молекулярним розміром (pSAM2, pVE1, pSN22, pSLG3, pIJ109 та pMG110) виявило, що pSS181 є новою плазмідною з відмінною нуклеотидною будовою. Так, наприклад, на плазміді pSS181 існують для рестриктази PstI 2 сайти рестрикції, тоді як на плазмідах pSN22 та pSLG3 є тільки по одному сайту, а плазміди pSAM2 та pIJ109 не мають жодного. Є відмінності в результатах гідролізу плазмід ендонуклеазою BamHI – з плазмиди pSS181 утворюються 2 BamHI-фрагменти, а плазмід pVE1 переходить в лінійну форму. На плазміді pSS181 є 9 сайтів для ферменту SalGI, на плазміді pMG110 сайт для цієї ендонуклеази є унікальним.

Таким чином, у штаму *Streptomyces* sp. 181 виявлено нову плазмідну pSS181 ($10,75 \pm 0,25$ тпн), яка має унікальний сайт для ендонуклеази EcoRI. Завдяки невеликому молекулярному розміру та наявності унікального сайту рестрикції плазмід може бути використана як основа при конструюванні вектора.

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СРЕПТОМИЦЕТНОЙ ПЛАЗМИДЫ pSS181

Резюме

Проведено рестрикционный анализ стрептомицетной плазмиды pSS181 с помощью 7 эндонуклеаз. Установлено наличие сайтов рестрикции для эндонуклеаз EcoRI, PstI, BamHI, SalGI и BglII. На плазмиде pSS181 обнаружен уникальный сайт для рестриктазы EcoRI и отсутствуют сайты рестрикции для эндонуклеаз HindIII и XbaI. Молекулярный размер плазмиды составляет $10,75 \pm 0,25$ тпн.

В результате гидролиза плазмидной ДНК парами эндонуклеаз (EcoRI + PstI) и (EcoRI + BamHI) установлено, что сайт рестрикции для фермента EcoRI расположен на больших PstI и BamHI-фрагментах.

V.V. Lukyanchuk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

RESTRICTION ANALYSIS OF STREPTOMYCES PLASMID pSS 181

Summary

Restriction analysis of plasmid was carried out with the use of 7 enzymes. Presence of restriction sites for endonucleases II EcoRI, PstI, BamHI, SalGI, and BglII was established. A unique restriction site for endonuclease EcoRI on the plasmid pSS181 was found out, but endonucleases HindIII and XbaI had no restriction sites on the plasmid. The molecular size of this plasmid was 10.75 ± 0.25 kb. As a result of hydrolysis of the plasmid DNA by pairs of endonucleases (EcoRI+PstI) and (EcoRI+BamHI) it was established, that the site of restriction for enzyme EcoRI was located on the biggest PstI and BamHI-fragments.

The paper is presented in Ukrainian.

К е y w o r d s: Streptomyces, plasmid, endonucleases, II type.

The a u t h o r ' s a d d r e s s: V. V. Lukyanchuk, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Валагурова В.Е., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*. Описание видов и компьютерная программа их идентификации // Киев: Наукова думка. — 2003. — 645 с.
2. Каталог фирмы МБИ. Fermentas. — 2006—2007.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. — Москва: Мир, 1984. — 450 с.
4. Bailey C.R., Bruton C.J., Butler M.J., Chater K.F., Harris J.E., Hopwood D.A. Properties of in vivo recombinant derivatives of pJV1, multi-copy plasmid from *Streptomyces phaeochromogenes*// J. General Microbiol. — 1986. — **132**, N 8. — P. 2071—2078.
5. Hopwood D.A., Kieser T. Conjugative plasmids in *Streptomyces* // Bacterial conjugation (ed. D.B. Clewell). — N-Y: Plenum, 1993. — P. 293—311.
6. Hopwood D.A., Kieser T., Lydiate D.J., Bibb M.J. *Streptomyces* plasmid: their biology and use as cloning vector //: The bacteria, V. IX, (eds Queener S.W., Day L.E.). — Academic Press, 1986. — P. 159—230.
7. Kataoka M., Seki T., Yoshida T. Five genes involved in self-transmission of pSN22, a *Streptomyces* plasmid// J. Bacteriol. — 1991. — **173**, N 13. — P. 4220—4228.
8. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid. — 1984. — **12**, N 1. — P. 19—36.
9. Klaus s., Krugel H., Walter F. Inverted repeats in the DNA of *Streptomyces* plasmids pMG110 and pMG120 // Mol Gen Genet. — 1984. — **197**, N 1. — P. 143—149.
10. Koraki T.G., Karagouni A.D. Occurrence and diversity of plasmids in population of *Streptomyces* in soil // Antonie van Leeuwenhoek. — 2000. — **78**, N 3—4. — P. 323—329.
11. MacNeil T., Gibbons P.H. Charakterization of the *Streptomyces* plasmid pVE1// Plasmid. — 1986. — **16**, N 3. — P. 182—194.
12. Meinhardt F., Schaffrath R., Larsen M. Microbial linear plasmids // Appl. Microbial. Biotechnol. — 1997. — **47**, N 4. — P. 329—336.
13. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study // J. General Microbiol. — 1989. — **80**, N 1. — P. 389—400.
14. Pernodet J.L., Simonet J.M., Querineau M. Plasmid in different strains of *Streptomyces ambifaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2 // Mol. Gen. Genet. — 1984. — **198**, N 1. — P. 35—41.

15. Thompson C.J., Ward J.M., Hopwood D.A. Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in *Streptomyces* // J. Bacteriol. – 1982. – 15, N 2. – P. 668–677.
16. Tichy L.N., Moskalenko L.N., Smrckova I., Krumphanzl V. Isolation and characterization of a plasmid pSLG3, from *Streptomyces lavendulae-grasseri* // FEMS Microbiol Lett. – 1985. – 27, N 1. – P. 65–68.
17. Toyama H., Okanishi M., Umezawa H. Physical characterization of plasmids from *Streptomyces kasugaensis* MB273 // Plasmid. – 1981. – 11, N 5. – P. 306–312.

Отримано 01.06.2008

УДК 579. 69:620.193.8

Ж.П. Коптева, В.В. Занина, А.Е. Коптева, В.Л. Айзенберг, А.В. Борисенко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ И КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ – ДЕСТРУКТОРОВ ЗАЩИТНЫХ ПОКРЫТИЙ

Изучены липолипидическая и каталазная активности бактерий – деструкторов защитных покрытий – при разных моделях роста: биоупленочной и планктонной. Показано, что синтез экзоферментов в биоупленке и планктоне отличается. В условиях биоупленочной формы роста усиливается удельная активность исследованных ферментов. Активность внеклеточных липазы и каталазы в биоупленке в 1,1–1,5 и 1,2–2,1 раза выше, чем в планктоне соответственно. С увеличением продолжительности опыта до 14 суток липолипидическая активность значительно уменьшается. Активность исследованных ферментов, продуцируемых бактериями-деструкторами, может быть использована для оценки биостойкости изоляционных покрытий, как показать их биодеградации в техногенных средах.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы покрытий, липаза, каталаза, биоупленка, планктон.

Почвенные микроорганизмы воздействуют на изоляционные материалы продуктами своего метаболизма, в первую очередь органическими и неорганическими кислотами, а также ферментами.

В процессе окисления, восстановления, гидролиза и других реакций микроорганизмы с помощью ферментов разрушают молекулы пластификаторов и стабилизаторов, ациклические и ароматические углеводороды, низкомолекулярные фракции покрытий, а также другие компоненты, входящие в их состав [2].

В доступной нам литературе встречаются единичные сведения о ферментативной активности бактерий – деструкторов защитных покрытий [12]. Приводятся данные, в основном, об активности окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов у микромицетов, которые повреждают строительные материалы, фенопласты, резину и др. [4].

Целью нашей работы было изучение липолипидической и каталазной активностей бактерий – деструкторов защитных покрытий.

Материалы и методы. Объектами исследований были бактерии *Pseudomonas* sp. штаммы 109 и Т/2, *Arthrobacter* sp. шт. 102 и *Bacillus* sp. штаммы 138 и 140, которые образовывали биоупленку на поверхности поврежденных защитных покрытий газопроводов [2].

Бактерии культивировали на жидкой среде Таусона с глюкозой (20 г/л) [8] с добавлением МПБ (20 мл на 100 мл среды) при температуре $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы пленочного покрытия Поликен 980-25 размером $40 \times 20 \times 0,5$ мм погружали в среду Таусона, инокулированную монокультурами исследованных бактерий. Посевной материал вносили в среду в количестве 10^6 кл/мл. Продолжительность опыта составляла 5 и 14 суток. Повторность опыта трехкратная.

После снятия эксперимента биоупленку десорбировали с поверхности покрытия в фиксированный объем 0,1 н фосфатного буфера (рН 7) с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН 2Т (частота 22 кГц) в течение 30 с (два раза с интервалом 2 мин). Планктонные клетки бактерий центрифугировали при 5000 об/мин в течение 40 мин для получения надосадочной жидкости.

Титр бактерий – начальный и конечный – определяли методом десятикратных предельных разведений [3].

© Ж.П. Коптева, В.В. Занина, А.Е. Коптева, В.Л. Айзенберг, А.В. Борисенко, 2009