

**В.В. Лук'яничук**

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

## **КЛОНУВАННЯ ПЛР-КОПІЙ ФРАГМЕНТА ХРОМОСОМИ *STREPTOMYCES COELICOLOR* A3(2)\***

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції ампліфіковано фрагмент хромосоми *Streptomyces coelicolor* A3(2), що містить ген полікетидсинтази III типу. Проведено клонування ампліфікованої ДНК в човниковому векторі pWHM4 по сайтах HindIII та EcoRI. Базуючись на даних рестрикційного аналізу плазмідних ДНК трансформантів встановлено, що молекулярний розмір проклованого фрагменту ДНК становить 1134 пн.

*Ключові слова:* ПЛР, клонування, PKS III, стрептоміцет.

Стрептоміцети відомі своєю здатністю синтезувати багато полікетидних сполук, які застосовуються в медицині й ветеринарії як антибіотичні, імуносупресорні та антигельмінтні препарати. Синтез полікетидного скелету здійснюється полікетидсинтазами. Однак наступні модифікації, які здійснюються рядом ферментів (циклази, оксидази, кеторедуктази, глікозил-трансферази тощо), необхідні для визначення біологічних функцій окремих полікетидних сполук [7, 8]. На даний час виявлено три типи полікетидсинтаз. Полікетидсинтази III типу (PKS III) – це невеликий комплекс із 2 однакових субодиниць, гомологічний за послідовністю амінокислот до родини халконсинтаз рослин (CHS) і споріднений структурно і функціонально з  $\beta$ -кетоацилсинтазами III типу синтаз жирних кислот. Гени полікетидсинтаз і завершальних ферментів зібрані на хромосомі у великі кластери. У геномі *S. coelicolor* A3(2) виявлено послідовності для трьох типів PKS, одна із яких SCO1206 кодує RppA-подібну THN-синтазу (PKS третього типу) [6, 7, 8].

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) – це швидкий метод ампліфікації чітко визначеної нуклеотидної послідовності ДНК. Одержані за допомогою ПЛР копії фрагменту ДНК мають широке застосування в наукових дослідженнях, наприклад, для клонування генів, введення мутацій, сиквенування, виділення генів та інше [4, 5].

Метою роботи є створення гібридної плазмідної конструкції, яка містить ген PKS III *Streptomyces coelicolor* A3(2). Надалі планується одержану плазмиду використати в дослідженні впливу детермінованих клонованим геном продуктів на біосинтетичні властивості продуцентів антибіотиків.

**Матеріали і методи.** В роботі використовувалися культури *Streptomyces coelicolor* A3(2) [1, 6] та *Escherichia coli* XL1 Blue (tet<sup>R</sup>) [2]. Вектором слугувала плазмідна рWHM4 (6,6 тпн)

© В.В. Лук'яничук, 2009

\* Робота виконана за рахунок фінансування Міністерством освіти і науки України договору від 06.06.2007 р. № Ф18/279-2007 «Клонування фрагмента хромосоми, що містить ген біосинтезу регулятора»

[11]. В роботі використовували середовища: соєве, S-середовище (рідкий варіант), МПА та МПБ [1, 10]. Для селекції трансформантів у середовище додавали антибіотики ампіцилін (100 мкг/мл) та тетрациклін (13 мкг/мл).

Плазмідну ДНК виділяли за методом Кізера [9]. Хромосому *Streptomyces coelicolor* A3(2) одержували згідно з Маніатісом і співавторів [3]. Гідроліз та лігування фрагментів ДНК проводили згідно з керівництвом [3]. В експериментах по гідролізу та лігуванню ДНК використовували ферменти та буфери фірми МВІ “Fermentas” (Литва).

Компетентні клітини *Escherichia coli* XL1 Blue одержували і трансформували за методами [3].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal (“Eppendorf”, Німеччина). Застосовували режим ПЛР: початкова денатурація – 95 °С – 120 с; 35 циклів: 96 °С – 20 с; 50 °С – 20 с; 60 °С – 240 с; заключна елонгація: 60 °С – 240 с. 20 мкл суміші (10 mM TrisHCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP) містила 0,5 одиниці Taq-полімерази, по 1 мкл кожного праймера (44,4 nM) та 50 нг тотальної ДНК *S. coelicolor* A3(2). Суміш нуклеотидів і Taq-полімерази використовували фірми МВІ “Fermentas” (Литва). Послідовності праймерів наведено в таблиці.

Таблиця

Послідовності праймерів, що були використані в роботі

Нуклеотидна будова праймерів	Напрямок	Ендонуклеаза
5'-TTTAAAGCTTATGGCGACTTGTGCAGACC-3'	прямий	HindIII
5'-TTTGAATTCATGCCTGCCTCACCCCTCCGC-3'	зворотній	EcoRI

Підкреслено нуклеотидні послідовності сайтів рестрикції

Електрофоретичне розподілення ПЛР продуктів проводили в 1,5 % агарозному гелі. Для визначення молекулярної маси одержаних продуктів ампліфікації використовували маркер молекулярного розміру 100 bp DNA Ladder фірми “Promega” (США).

**Результати та їх обговорення.** На базі інформації про нуклеотидну будову PKS III *S. coelicolor* A3(2) було підібрано нуклеотидну будову пари праймерів (прямий та зворотний) для ПЛР [6]. Кожен олігонуклеотид містив по 20 н відповідної послідовності гена PKS III *S. coelicolor* A3(2) та нуклеотидну послідовність сайту пізнавання для відповідної ендонуклеази рестрикції. Клонування одержаних ПЛР-продуктів у складі човникового вектора pWHM4 було вирішено провести по унікальним сайтам рестрикції для EcoRI та HindIII, що знаходяться в полілінкерному фрагменті вектору pWHM4 і не мають сайтів на гені PKS III (1125 пн) [6]. До складу прямого праймеру входить послідовність сайту пізнавання для ендонуклеази HindIII, а до складу зворотнього праймеру – сайт для рестриктази EcoRI (таблиця).

ПЛР-продукти, одержані за допомогою ПЛР на цільовому фрагменті, досліджували електрофоретичним розподіленням в агарозному гелі. Було одержано ПЛР-амплікони молекулярним розміром 1,144 тпн. Довжину було вираховано за даними електрофоретичного розподілу ПЛР-продуктів та на основі інформації про первинну будову відповідного фрагменту хромосоми *S. coelicolor* A3(2) [6].

ПЛР-продукти і ДНК вектору pWHM4 обробляли ендонуклеазами II типу EcoRI і HindIII та проводили спільне лігування одержаних рестриктів. Лігуюною сумішшю трансформували компетентні клітини кишкової палички. Відбирали трансформанти стійкі до ампіциліну та тетрацикліну. Стійкість до тетрацикліну детермінується хромосоною реципієнту, в той час як стійкість до ампіциліну забезпечується геном вектору pWHM4.

Виділені з ряду Ar<sup>R</sup> Tet<sup>R</sup> трансформантів позахромосомні ДНК мали однаковий молекулярний розмір. Електрофоретичне розділення продуктів гідролізу ендонуклеазами EcoRI та HindIII плазмідних ДНК декількох трансформантів продемонструвало наявність 2 фрагментів: 6,6 тпн та 1,1 тпн (рисунок). Враховуючи те, що гідроліз ПЛР-копійованої ДНК рестриктазами EcoRI та HindIII зменшує її молекулярний розмір на 10 пар нуклеотидів, точний розмір клонованого фрагменту становить 1134 пн.

Таким чином: 1. На базі інформації про нуклеотидну послідовність гену, що детермі-

нує фермент PKS III *S. coelicolor* A3(2) було підібрано оптимальні нуклеотидні послідовності пари праймерів (прямий та зворотній) для проведення ПЛР. Було одержано ПЛР-амплікони молекулярним розміром 1,144 тпн.

2. Було успішно підібрано систему для клонування ампліфікованої ДНК (що складалася з вектора рWHM4 та реципієнтного штаму *Escherichia coli* XL1 Blue). Гібридні плазмиди Ap<sup>R</sup>Tet<sup>R</sup> трансформантів містили клонований фрагмент стрептомицетної хромосоми молекулярним розміром 1,134 тпн.

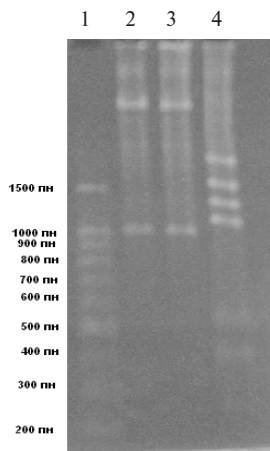


Рисунок. Електрофоретичне розподілення фрагментів плазмідних ДНК трансформантів:

- 1 – 100 bp DNA Ladder,  
2 – плазміда трансформанту №6 + EcoRI + HindIII,  
3 – плазміда трансформанту №8 + EcoRI + HindIII,  
4 – плазміда трансформанту №6 + BglI.

*В.В. Лукьянчук*

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

### КЛОНИРОВАНИЕ ПЦР-КОПИЙ ФРАГМЕНТА ХРОМОСОМЫ *STREPTOMYCES COELICOLOR* A3(2)

#### Резюме

С помощью полимеразной цепной реакции амплифицировано фрагмент хромосомы *Streptomyces coelicolor* A3(2), который содержит ген поликетидсинтазы III типа. Проведено клонирование амплифицированной ДНК в челночном векторе рWHM4 по сайтам HindIII и EcoRI. Основываясь на данных рестрикционного анализа, установлено, что молекулярный размер клонированного фрагмента ДНК – 1134 пн.

Ключевые слова: ПЦР, клонирование, PKS III, стрептомицет.

*V. V. Lukyanchuk*

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

### CLONING OF PCR-COPIES OF *STREPTOMYCES COELICOLOR* A3(2) CHROMOSOME FRAGMENT

#### Summary

Copies of chromosome *Streptomyces coelicolor* A3(2) fragment (gene coding polyketide syntase of III type) were obtained to use polymerase cycle reaction. Amplified DNA was cloned in shuttle vector рWHM4 on sites for HindIII and EcoRI. The restriction analysis of plasmid DNAs of transformants has demonstrated that molecular size of cloned DNA fragment was 1134 bp.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: PCR, cloning, PKS III, *Streptomyces coelicolor*.

The author's address: *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: Наук. думка. –2003. – 645 с.
2. Каталог фирмы МВІ. “Fermentas”. – 2007-2008.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – Москва: Мир. – 1984. – 450 с.
4. Методы молекулярной генетики и геномной инженерии / Под ред. Салганника Р.И. – Новосибирск: Наука. – 1990. – 256 с.
5. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Под ред. Прокофьева М.А. – Москва: Издательство МГУ. –1985. – 279 с.
6. Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M. et al. Complete genome sequence of the model actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Nature*. –2002. – **417**, № 6885. – P. 141–147.
7. Cortes J., Velasco J., Foster G. et al. Identification and cloning of a type III polyketidesynthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea* // *Mol. Microbiol.* – 2002. –**44**, №5. – P. 1213–1224.
8. Funa N., Ohnishi Y., Ebizuka Y., Horinouchi S. Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide- synthase by site-directed mutagenesis // *Biochem. J.* – 2002. –**367**, №3. – P. 781–789.
9. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // *Plasmid*. –1984. –**12**, №1. – P.19–36.
10. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study // *J. General Microbiol.* –1989. –**80**, №1. –P.389–400.
11. Vara j., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y.-G. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*) // *J. Bacteriology*. – 1989. – **171**, №3. –P.5872–5881.

Отримано 12.10.2008