

В.В. Лук'ячук, Л.В. Поліщук

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

КОНСТРУЮВАННЯ НОВОГО БІФУНКЦІОНАЛЬНОГО ВЕКТОРА, ЩО МІСТИТЬ *egfp*-ГЕН

*Створено п'ять біфункціональних векторних конструкцій (pTrE1, pTrE5, pTrH2, pTrH7, pTrS1) з молекулярним розміром 11,3 тпн. Векторні плазмідні здатні реплікуватися, стабільно підтримуватися та експресуватися в клітинах як в грамнегативного (*Escherichia coli* XL1 Blue), так і грампозитивного (*Streptomyces levoris* 165) мікроорганізмів.*

*Дані біфункціональні вектори містять гени стійкості до 3 антибіотиків. Гени стійкості до ампіциліну та канаміцину експресуються в клітинах *E. coli*, ген стійкості до тіострептону забезпечує резистентність клітин стрептоміцету до даного антибіотику.*

*Доведено, що всі досліджені сконструйовані плазмідні містять активний *egfp*-ген, що дозволяє візуальне вивчення *in vivo* функціонування продуктів клонованого в полілінкер pEGFP-C1 гену.*

*Ключові слова: вектор, *Escherichia coli*, *Streptomyces levoris*, *egfp*-ген, флуоресценція, антибіотик, рестриктаза II типу.*

На даному етапі розвитку генної інженерії більшість векторів для клонування та експресії генів, а також методик введення чужорідного генетичного матеріалу розроблено для маніпуляцій з грамнегативними мікроорганізмами [2]. Вчені у багатьох лабораторіях світу докладають значні зусилля для конструювання векторів для грампозитивних мікроорганізмів та біфункціональних [6]. В останньому випадку, як грамнегативний реципієнт використовують різні штами *Escherichia coli*, а у ролі грампозитивних реципієнтів – штами різних видів родів *Streptomyces* та *Corynebacterium* [2, 6, 8].

При конструюванні векторних молекул великої уваги надається (крім наявності origin та гер-генів обох господарів) наявності селективних маркерів для відбору клітин мікроорганізмів, що містять гібридні плазмідні ДНК [2, 6, 8].

Останнім часом розроблено ряд векторів, що містять у ролі селективних маркерів *gfp*-ген (**green fluorescent protein**) медузи *Aequorea victoria* чи його похідні [9, 10, 11]. Використання продукту цього гену - GFP-білка (білка зеленої флуоресценції) дозволяє не тільки визначити наявність у позахромосомній молекулі клонованої послідовності ДНК, але і місце розташування *in vivo* продукту експресії клонованого гену [4, 5, 7]. Злиття послідовностей *gfp*-гену та клонованого гену не заважає ні експресії останнього, ні його функціонуванню [4, 5, 7, 9, 10, 11]. Для візуалізації наявності GFP-білка достатньо провести опромінення нативних клітин синім світлом (488 нм) [9, 10, 12, 15].

Мета роботи – створення нового біфункціонального вектора (*Streptomyces* – *Escherichia coli*), який містить *egfp*-ген, що кодує флуоресцентний білок-маркер EGFP.

Матеріали і методи. *Штами.* В роботі використовували штам *Streptomyces levoris* 165, штам *Escherichia coli* XL1 Blue (Tet^r) [3].

Плазмідні. В експериментах використовували вектори pWHM4 Tsr^r Amp^r (6,6 тпн) та pEGFP-C1 Kan^r *gfp* (4,7 тпн) (рис. 1) [11, 13].

Середовища. В експериментах використовували середовища МПБ, МПА, середовища сосеве, Оканіші, R2 та R3 [1, 6, 8]. Для відбору, вирощування та зберігання трансформантів *E. coli* використовували середовище МПА та МПБ з ампіциліном (100 мкг/мл), канаміцином (50 мкг/мл) та тетрацикліном (13 мкг/мл); трансформанти *S. levoris* відбирали, вирощували та зберігали на середовищах, що містили тіострептон (50 мкг/мл).

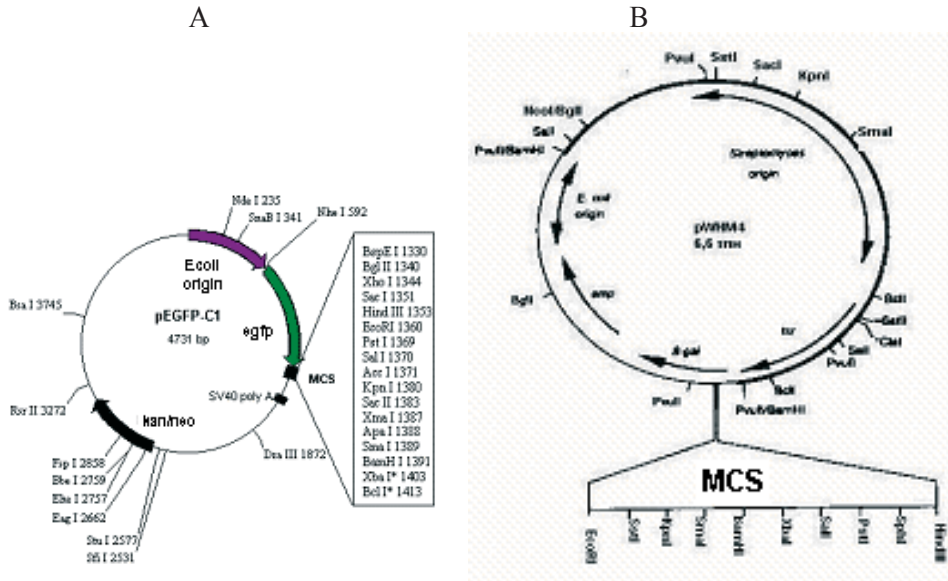


Рис. 1. Рестрикційні карти векторних плазмід pEGFP-C1 (А) та pWHM4 (В).

kan/neo – ген стійкості до канаміцину/неоміцину; amp – ген стійкості до ампіциліну; tsr – ген стійкості до тіострептону; MCS – полілінкер; egfp-ген – ген зеленого флуоресцентного білка, β-gal – бета-галактозидазний оперон; E.coli origin – колійний ориджин реплікації ; Streptomyces origin – ориджин реплікації в стрептоміцетах.

Методи. Виділення плазмідної ДНК із трансформантів *E. coli* та *S. levoris* проводили за методом Кізера [6].

Рестрикцію ДНК ендонуклеазами рестрикції проводили за методом Маніатіса [2]. В роботі використовували рестриктази і стандартні буфера для рестрикції фірми «Ферментас» [3]. Дефосфорилювання фрагментів ДНК проводили лужною фосфатазою зі шлунку теляти фірми „Ферментас» [3].

Лігування фрагментів ДНК проводили за допомогою лігази фага Т4 за методикою, запропонованою Маніатісом [2]. В роботі використовували лігазу фірми «Ферментас» [3].

Електрофорез плазмід та їх фрагментів проводили в горизонтальному апараті PS 250-2 («Sigma», США) з розмірами геля 85 мм x 125 мм або 55 мм x 80 мм, при напрузі 5 в на 1 см . Використовували 0,8 % агарозний гель, що готували на трис-боратному буфері: 89 mM Трис-основа , 89 mM борна кислота, 2,5 mM Na-ЕДТА, рН-8,3. Гелі фарбували в розчині бромистого етидію 1 мкг/мл, проглядали та фотографували в УФ-променях із довжиною хвилі 254 нм через оранжевий фільтр [3]. Для гелелектрофорезу використовували агарозу фірми «Chemarol».

Отримання компетентних клітин *E. coli* та їх трансформацію проводили за методиками Маніатіса [2]. Трансформанти відбирали на середовищі МПА, яке містило канаміцин, тетрациклін, ампіцилін, IPTG (ізопропіл-β-D-1-тиогалактопіранозид) та Z-gal (5-бром-3-индолил-β-D-галактопіранозид) [2]. Відбирали колонії білого кольору, плазмідні ДНК яких містили вставку у бета-галактозидазному гені плазміді рWHM4 [13].

Протопласти стрептоміцету *Streptomyces levoris* 165 отримували за методикою, запропонованою Хопвудом [6]. Трансформовані протопласти регенерували на середовищі R2 [6, 8]. При селекції трансформантів використовували напіврідке середовища R3, яке містило 100 мкг/мл тіострептону [6, 8].

Конфокальна мікроскопія. Для візуалізації наявності EGFP-білка в клітинах стрептоміцентних трансформантів проводили їх опромінення синім світлом із довжиною хвилі 488 нм та фіксували пік флуоресценції зеленим світлом із довжиною хвилі 507 нм [12, 15].

Результати та їх обговорення. Зелений флуоресцентний білок (англ. green fluorescent protein, GFP), знайдений у антарктичної медузи став одним із білків-маркерів, що широко використовуються в клітинній і молекулярній біології [9]. У даний час GFP-подібні білки (наприклад EGFP – enhanced green fluorescent protein – детермінований egfp-геном вектора pEGFP-C1) застосовуються як візуальні мітки при вивченні *in vivo* різних клітинних процесів як у еукариот (простіші, гриби, рослини, тварини), так і у прокариот (бацили, лактококи, мікобактерії, стрептоміцети) [7, 11]. Як приклад можна навести встановлення ролі *ftsZ*-гену, який локалізований на плазміді pBM400, у процесі поділу клітин *Bacillus megaterium* завдяки використанню GFP-маркера [14].

Завдання роботи – створення біфункціонального вектора (*Streptomyces – Escherichia coli*), який здатний не тільки забезпечити селекцію трансформантів із використанням антибіотиків, але і дозволяє візуальне і прижиттєве вивчення у динаміці локалізацію синтезу і функціонування продуктів клонованого гену. Для цього було вирішено клонувати *egfp*-ген (788 пн) з плазмиди pEGFP-C1 у біфункціональному векторі pWHM4.

Першим етапом роботи було проведено об'єднання послідовностей плазмідних векторів pWHM4 Tsr^r Amp^r (6,6 тпн) та pEGFP-C1 Kan^r gfp (4,7 тпн). Було вирішено провести їх об'єднання за двома схемами (табл. 1):

Таблиця 1

Схеми створення гібридних плазмідних конструкцій

№ схеми	Векторні плазмиди	Використані ендонуклеази II типу		Молекулярні розміри гібридних конструкцій, тпн
		Ферменти	Кількість утворених фрагментів плазмід та їх розмір, тпн	
1	pWHM4	EcoR1	1 – 6,6	11,3 (pTrH2, pTrH7)
	pEGFP-C1		1 – 4,7	
	pWHM4	HindIII	1 – 6,6	11,3 (pTrH2, pTrH7)
	pEGFP-C1		1 – 4,7	
2	pWHM4*	SalG1	7 – 0,8; 2,5; 3,3; 3,3 (0,8+2,5); 4,1 (0,8+3,3); 5,8 (2,5+3,3); 6,6 (лінійна)	11,3 (pTrS1)
	pEGFP-C1		1 – 4,7	

Примітка: * - частковий гідроліз векторної ДНК

Плазмідні ДНК гідролізували окремо рестриктазами EcoR1 чи HindIII. Сайти рестрикції для ендонуклеаз EcoR1 чи HindIII є унікальними для обох плазмід і обидва локалізовані на їх полілінкерних послідовностях.

Лігування відповідних лінійних форм двох плазмід призводить до утворення гібридних конструкцій молекулярним розміром 11,3 тпн.

Плазмідні ДНК гідролізували рестриктазою SalG1. Для рестриктази SalG1 на векторі pWHM4 існують 3 сайти рестрикції та тільки один відповідний сайт на плазміді pEGFP-C1. У цьому випадку проводили неповний гідроліз плазмиди pWHM4. Завдяки застосованій схемі селекції, було також відібрано векторні конструкції з молекулярним розміром 11,3 тпн.

Отриманими гібридними ДНК трансформували компетентні клітини штаму *Escherichia coli* XL1 Blue (Tet^r). Трансформовані клітини висівали на середовище МПА з трьома антибіотиками (ампіциліном, канаміцином, тетрацикліном), IPTG та Z-gal. Відбирали білі Amp^r Kan^r Tet^r колонії трансформантів.

Було встановлено, що відібрані Amp^r Kan^r Tet^r трансформанти кишкової палички містили позакромосомні ДНК з молекулярним розміром 11,3 тпн (рис. 2). Рестрикційний аналіз із використанням рестриктаз SalG1, EcoR1 чи HindIII плазмід ряду відібраних трансформантів (наприклад TrH2, TrH7, TrE1, TrE5, TrS1) продемонстрував, що при гідролізі всі плазмиди утворюють фрагменти з молекулярним розміром 4,7 тпн та 6,6 тпн, що підтверджує отримання молекул бажаної конструкції (рис. 3). Єдиною гібридною конструкцією, яка може міститися у білих Amp^r Kan^r Tet^r трансформантах (у випадку застосування рестриктази SalG1) є сконструйована плазмиди, що містить лінійну форму плазмиди pWHM4 при гідролізі її по сайту, що розташований у її полілінкері. Тільки така конструкція після трансформації нею

протопластів *Streptomyces levoris* 165 здатна функціонувати і забезпечити стійкість стрептоміцетних трансформантів до тіострептону.

Гібридними плазмідними ДНК, створеними об'єднанням лінійних форм ДНК плазмід по сайтам EcoRI (pTrE1, pTrE5), HindIII (pTrH2, pTrH7) та SalGI (pTrS1) трансформували протопласти *Streptomyces levoris* 165. Після регенерації протопластів та селекції стійких до тіострептому трансформантів проводили виділення позахромосомних ДНК Tsr^r культур і їх рестрикційний аналіз. Плазмиди отриманих стрептоміцетних Tsr^r трансформантів розщеплювалися під дією відповідних ферментів на 2 фрагменти (4,7 та 6,6 тпн) – тобто зберегли їх молекулярний розмір, будову та експресію стрептоміцетних оперонів та tsr^r-генів.

Отже, можна стверджувати, що було отримано нові (pTrE1, pTrE5, pTrH2, pTrH7, pTrS1), біфункціональні векторні плазмиди (*Streptomyces* – *Escherichia coli*), що детермінують стійкість до 3 антибіотиків (ампіцилін та канаміцин – гени експресуються в *E. coli*, тіострептон – ген експресується в стрептоміцетах).

Для підтвердження успішного виконання поставленого завдання було необхідно дослідити наявність експресії EGFP-білка з egfp-гена гібридних плазмід та здатність відібраних трансформантів *Streptomyces levoris* 165 світитися у зеленому діапазоні при освітленні їх синім світлом. Було встановлено, що досліджувані трансформанти містили білки, які були здатні до зеленої флуоресценції при освітленні їх променями світла з довжиною хвилі 488 нм на відміну від реципієнтного штаму (рис. 4).

Таким чином, створено ряд векторних конструкцій (11,3 тпн), що здатні реплікуватися, підтримуватися та експресуватися як в грамнегативному, так і грампозитивному мікроорганізмах. Дані плазмиди містять гени стійкості до 3 антибіотиків (ампіцилін та канаміцин – гени експресуються в *E. coli*, тіострептон – ген експресується в стрептоміцетах) та egfp-ген, що дозволяє візуальне *in vivo* вивчення функціонування продуктів клонованого в полілінкер гену.

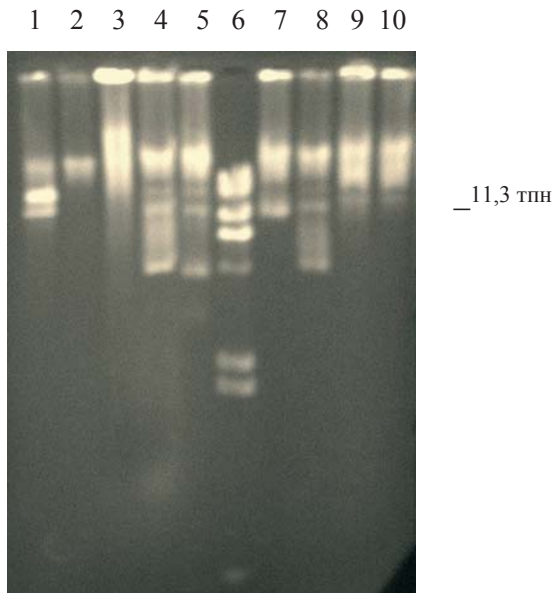


Рис. 2. Електрофореграма плазмідних ДНК трансформантів:

- 1 – вектор pWHM4+EcoRI; 2, 3 – *Escherichia coli* XL Blue1;
4, 5 – трансформанти pWHM4 + pEGFP-C1 (HindIII); 6. – λ + HindIII,
7-10 – трансформанти pWHM4 + pEGFP-C1 (HindIII).

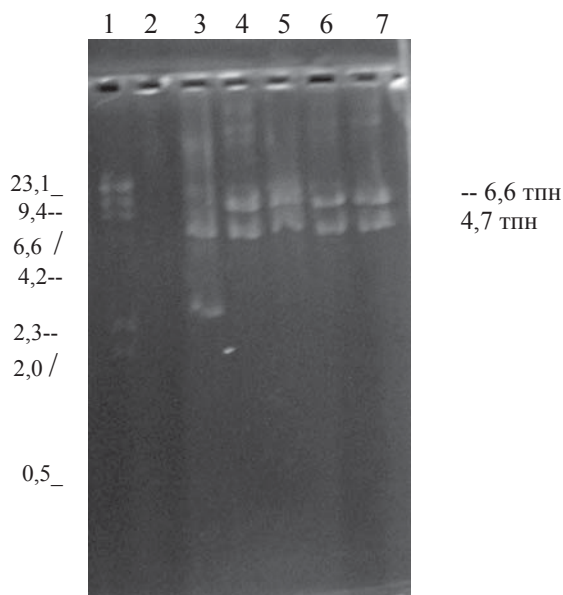


Рис. 3. Электрофоретичне розподілення рестриктів плазмід трансформантів кишкової палички:
 1 – λ + HindIII, 2 – pEGFP-C1; 3 – TrE1+EcoRI, 4 – TrE5+EcoRI, 5 – TrH2+ HindIII,
 6 – TrH7 + HindIII

Примітка: Л1 – лінійна та ССК – суперскручена кільцева форми плазмиди pEGFP-C1.

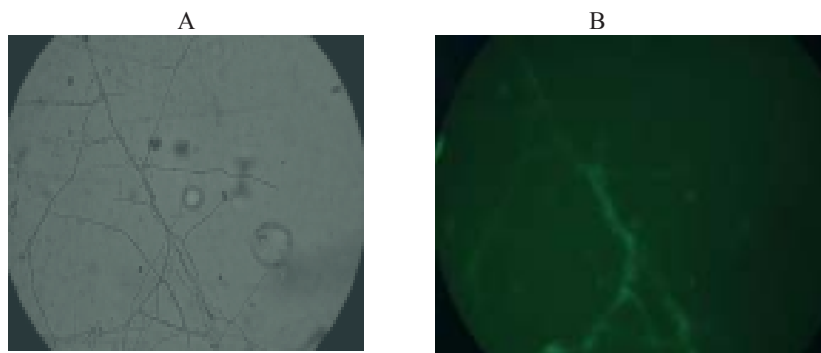


Рис. 4. Міцелій трансформанту *Streptomyces levoris* 165 (pTrS1) у видимому світлі (зліва) та при освітленні синіми променями (488 тпн) (справа).

Лукьянчук В.В., Полищук Л.В.

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

КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВОГО БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО egfp-ГЕН

Резюме

Создано ряд бифункциональных векторных конструкций (pTrE1, pTrE5, pTrH2, pTrH7, pTrS1) с молекулярным размером 11,3 тпн. Векторные плазмиды способны реплицироваться, стабильно поддерживаться и экспрессироваться как в грамотрицательных (*Escherichia coli* XL1 Blue), так и в грамположительных (*Streptomyces levoris* 165) культурах. Данные бифункциональные векторы содержат гены устойчивости к 3 антибиотикам. Гены устойчивости к ампициллину и канамицину экспрессируются в клетках *E. coli*, ген устойчивости к тиострептому обеспечивает резистентность клеток стрептомицета к данному антибиотику. Доказано, что все исследованные плазмиды содержат активный egfp-ген, позволяющий визуальное исследование *in vivo* функционирования продуктов клонированного в полилинкер pEGFP-C1 гена.

Ключевые слова: вектор, *Escherichia coli*, *Streptomyces levoris*, egfp-ген, флуоресценция, антибиотик, рестриктаза II типа.

V.V. Lukyanchuk, L.V. Polishchuk

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

CONSTRUCTION OF A NEW BIFUNCTIONAL VECTOR WHICH CONTAINS egfp-GENE

S u m m a r y

A number of bifunctional vector structures (pTpE, pTpE5, pTpH2, pTpH7, pTpS1) with molecular dimension of 11.3 kb has been created. Vector plasmids can be replicated, sustainably maintained and expressed both in Gram-negative (*Escherichia coli* XL1 Blue) and in Gram-positive (*Streptomyces levoris* 165) cultures. The given bifunctional vectors contain genes of resistance to 3 antibiotics. Genes of resistance to ampicillin and canamycin are expressed in *E. coli* cells, gene of resistance to thiostrepton ensures the resistance of streptomycete cells to the given antibiotic. It is proved that all the studied plasmids contain active egfp-gene which allows the visual study *in vivo* of the functioning of the products of pEGFP-C1 gene cloned to polylinker.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у в о р д с: вектор, *Escherichia coli*, *Streptomyces levoris*, egfp-ген, флуоресценция, антибиотик, рестриктаза II типа.

Т е а у т о р ' с а д д р е с s: Lukyanchuk V.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*. —К.:Наука. Думка, 2003. — 645 с.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. — М.: Мир- 1984. — 450 с.
3. Каталог фирмы MBI. Fermentas — 2006-2007.
4. Araujo S.J., Wood, R.D. Protein complexes in nucleotide excision repair // Mutat. Res. — 1999. — 435. — P. 23–33.
5. Houtsmuller A.B., Rademakers S., Nigg A.L., Hoogstraten D., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells // Science — 1999. — 284. — P. 958–961.
6. Kieser T., Bibb M.J., Chatre K.F., Buttner M.J., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics: a laboratory manual. — Norwich (Unated Kingdom): John Innes Foundation, 2000. — 424 p.
7. Mu D., Wakasugi M., Hsu D.S., Sancar A. Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease // J. Biol. Chem. — 1997. — 272. — P. 28971–28979.
8. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study // J. General Microbiol. — 1989. — 80, N1. — P.389–400.
9. Phillips G. Green fluorescent protein—a bright idea for the study of bacterial protein localization // FEMS Microbiol Lett. — 2001. — 204, N1. — P. 9–18.
10. Prendergast F, Mann K. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea* // Biochemistry. — 1978. — 17, N17. — P. 3448–3453.
11. Shelley R. McRae, Christopher L. Brown and Gillian R. Bushell. Rapid purification of EGFP, EYFP, and ECFP with high yield and purity // Protein Expression and Purification. — 2005. — 41, N 1. — P.121–127.
12. Segers-Nolten G. M. J., Wyman C., Wijgers N., Vermeulen W., Lenferink A. T. M, Hoeijmakers J. H. J., Greve J., Otto C. Scanning confocal fluorescence microscopy for single molecule analysis of nucleotide excision repair complexes // Nucleic Acids Res. — 2002. — 30, N 21. — P.4720–4727.
13. Vara J., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y. G., Donadio S., Hutchinson C. R. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*) // J Bacteriol. — 1989. — 171, N 11. — P. 5872–5881.
14. White C.A., Lukyanchuk V.V., Scholle M., Kunnimalayaan M., Vary P.S. The indigenous plasmids of *Bacillus megaterium* QM B1551 carry some surprising genes including a functional division gene *ftsZ* // Wind River Conference on Prokaryotic Biology. — Estes Park, CO, 2006. — P. 75–76.
15. Weiss S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecule // Science. — 1999. — 283. — P. 1676–1683.

Отримано 13.04.2011