

Виділення і рестрикційний аналіз двох плазмід *Streptomyces globisporus* 1912

Б. П. Мацелюх, В. В. Лук'янчук, Л. В. Поліщук, А. Б. Мацелюх, Ю. Рор¹

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

¹ Інститут органічної хімії Геттінгенського університету, Німеччина
Геттінген, Тамманштрассе, 2

Сумарну плазмідну ДНК, виділену за допомогою лужної денатурації і нагрівання лізатів міцелію, очищено в східчастому градієнті щільності хлористого цезію і розділено на дві фракції електрофорезом у гелі звичайної і легкоплавкої агарози. Рестрикційний аналіз фракцій ДНК показав наявність двох плазмід рSG1912-1 і рSG1912-2, розміри яких становлять 10,3 і 22,4 тис. пар нуклеотидів відповідно. Обидві плазмиди стабільно виділяються із штамів стрептоміцета з різними рівнями споруючості та синтезу ландоміцину E.

Вступ. Стрептоміцети — найвисокорозвиненіші прокаріотичні мікроорганізми з міцеліальною будовою клітин і спороутворенням, що становлять значний науковий інтерес для генетики і мають не менше практичне значення для біотехнології як промислові продуценти більшості описаних антибіотиків. Раніше було показано, що штам *S. globisporus* 1912, виділений у 1967 р. з каштанового ґрунту, містить плазмідну ДНК і синтезує антибіотик невідомої природи, який пригнічує ріст грампозитивних мікроорганізмів, особливо стрептоміцетів [1]. Зроблено спроби рестрикційного аналізу виділеної ДНК плазмиди [2] і клонування фрагментів плазмиди в складі вектора *pUC19* у клітинах кишкової палички [3]. За даними попереднього аналізу, розмір плазмиди дорівнює 11,2 тисяч пар нуклеотидів (тис. п. н.). Антибіотична речовина, виділена з агаризованого середовища дводобової культури стрептоміцета, має також протипухлинну активність, пригнічуючи ріст карциноми Герена шурів [4]. Недавно в співробітництві з німецькими вченими було встановлено молекулярну структуру антибіотика, яким виявилася ще не описана сполука полікетидної природи з групи ангуциклінів — ландоміцин E [5].

Метою цієї роботи було більш досконале

дослідження кількості і розмірів плазмід, що успадковуються вихідним штамом *S. globisporus* 1912, а також його похідними субклонами з різними рівнями споруючості і синтезу антибіотика. Це дало б змогу виявити залежність між такими важливими ознаками культури, як споруючість, утворення антибіотика і успадкування плазмід.

Матеріали і методи. У роботі використано три штами *S. globisporus* 1912, одержані при моноспоровому розсіві вихідної культури: 1) штам, що нагадує вихідну культуру — добре споруює, синтезує антибіотик у незначній кількості і при розсіві вищепляє три типи колоній; 2) стабільний клон, який слабо споруює і має середній рівень антибіотичної активності; 3) стабільний клон, який не споруює і синтезує велику кількість ландоміцину E.

Плазмідну ДНК виділяли за методом Кайзера [6] з міцелію дводобової культури, вирощеної в колбах на качалці в середовищі (г/л): K_2HPO_4 — 2,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5, глюкоза — 1,0, пептон — 4,0, дріжджовий екстракт — 4,0, екстракт солоду — 1,0, рН до стерилізації — 7,2. Міцелій лізували в ТЕ-буфері (25 мМ трис, 25 мМ Na_2EDTA , рН 8,0) лізоцимом (2 мг/мл) при 37 °С протягом 30 хв, до лізату додавали 0,5 об'єму 0,3 М NaOH з 1 % додецилсульфатом натрію, суміш старанно перемішували (тричі пропускали через

20 мл пластиковий шприц) і нагрівали при 60 °С протягом 30 хв. Після охолодження лізат обробляли кислим фенолом—хлороформом (1:1), до супернатанту додавали десятю частину 3 М ацетату натрію і рівний об'єм ізопропанолу. Осад після центрифугування висушували і розчиняли в ТЕ-буфері. Одержану плазмідну ДНК очищали ультрацентрифугованням при 50 тис. об/хв і 18 °С протягом 4 год в східчастому градієнті щільності хлористого цезію [7]. Бромистий етидій екстрагували водонасиченим *n*-бутанолом і ДНК осаджували після трикратного розведення деіонізованою водою в 2,5 об'єму етанолу. Далі плазмідну ДНК фракціонували за допомогою електрофорезу в 0,7 %-му агарозному гелі, використовуючи ТВЕ-буфер [8]. Гель фарбували бромистим етидієм і під УФ світлом вирізали перед смугами плазмідної ДНК квадрати відповідної величини, заповнивши пустоти 0,8 %-ю легкоплавкою агарозою. Електрофорез продовжували до появи смуг плазмідної ДНК у гелі легкоплавкої агарози. Окремі смуги (фракції) плазмідної ДНК вирізали разом з гелем, нагрівали в ТЕ-буфері до 65 °С протягом 10 хв і очищали повторно обробкою фенолом, фенолом—хлороформом і хлороформом. ДНК осаджували етанолом і розчиняли в бідестильованій воді. Плазмідну ДНК, очищену таким чином, використовували для рестрикційного аналізу за допомо-

гою *Bgl*II, *Kpn*I, *Pvu*II і *Sac*I ендонуклеаз. *Hind*III-фрагменти ДНК фага лямбда служили стандартами для побудови калібрувальної кривої для визначення розмірів досліджуваних плазмід. У роботі використано реактиви фірми «Sigma» (США) для молекулярно-біологічних досліджень.

Результати та обговорення. На рис. 1 наведено гель-електрофореграму трьох препаратів плазмідної ДНК, виділеної із штамів з різними рівнями споруючості і антибіотикоутворення після попереднього очищення в градієнті щільності хлористого цезію. Плазмідна ДНК добре виражена двома смугами різної інтенсивності, які знаходяться в зоні гелю легкоплавкої агарози. ДНК нижньої зони, одержана в аналогічному попередньому досліді і нанесена на доріжку 9, утворює дві смуги — одну у верхній і одну у нижній зонах. Отже, можна припустити, що плазмідна ДНК нижньої зони представлена ковалентно замкненими кільцевими молекулами (КЗК), які після повторних обробок фенолом, фенолом—хлороформом і хлороформом при очистці від агарози зазнають одностороннього розриву, перетворюючись частково у відкриті кільцеві молекули (ВК). Чотири препарати плазмідної ДНК одержано із легкоплавкого гелю і їхні електрофоретичні профілі наведено на рис. 2. Препарат 1 виділений із нижньої зони споруючого штаму, препарат 2 — з тієї ж зони

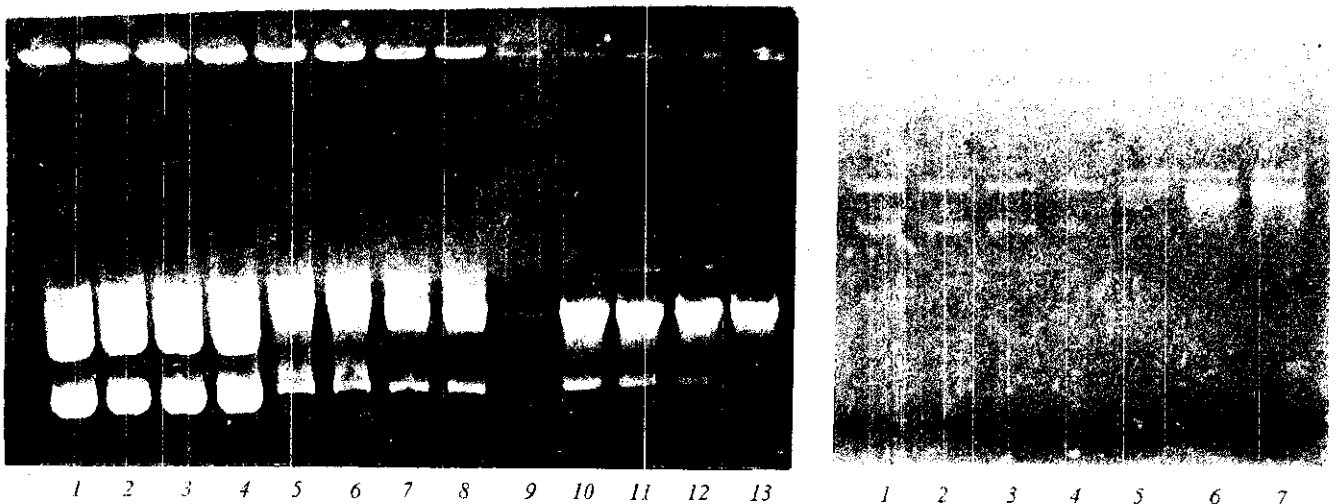


Рис. 1. Електрофореграма плазмідної ДНК, яка проникла в межі гелю легкоплавкої агарози і виділена із споруючого (1—4), слабоспоруючого (5—8) і неспоруючого (10—13) штамів, а також з гелю легкоплавкої агарози, що містила нижню смугу ДНК (9)

Рис. 2. Електрофореграма плазмідної ДНК, виділеної з гелю легкоплавкої агарози (рис. 1): 1, 2 — ДНК з нижньої смуги споруючого штаму, розведена в 2 і 3 рази відповідно; 3, 4 — ДНК з нижньої смуги слабоспоруючого і неспоруючого штамів, розведена в 2 і 3 рази відповідно; 5 — ДНК з верхньої смуги споруючого штаму; 6, 7 — суміш ДНК з верхньої смуги слабоспоруючого і неспоруючого штамів

слабоспорулюючого та неспорулюючого штамів. Відповідно виділено препарати 3 і 4 з верхньої зони. Як видно на рис. 2, обидва препарати ДНК з нижньої зони утворюють в гелі дві однакові за положенням смуги, тобто вони належать меншій за розмірами плазміді і представлені двома конформаційними станами молекул — КЗК і ВК. Натомість препарати ДНК 3 і 4 з верхньої зони утворюють в гелі три тісніше розміщені смуги, з яких верхня і нижня чітко відрізняються від смуг попередньої плазміді, і тому немає сумніву, що вони належать іншій і більшій за розмірами плазміді. Згадані смуги також утворюються КЗК і ВК молекулами. Середня смуга може бути ВК-формою меншої плазміді. Наші припущення щодо наявності двох плазмід в різних конформаційних станах були підтверджені даними рестрикційного аналізу. Як впливає з даних рис. 3 і 4, препарати ДНК нижньої зони дають аналогічні за розмірами і кількістю фрагменти ДНК після рестрикції, що свідчить про їхню належність до меншої за розмірами плазміді, яку ми назвали *pSG1912-1*. Ця плазміда має один сайт рестрикції для *SacI*. Перетворюючись після перевару у лінійну молекулу розміром 10,3 тис. п. н. (доріжки 3 і 14 рис. 3).

Рестриктаза *PvuII* (доріжка 8, рис. 2 і доріжка 5, рис. 3) розрізає молекулу ДНК плазміді у двох сайтах, спричинюючи появу двох фрагментів ДНК розмірами 8,5 і 1,8 тис. п. н. *KpnI* сама, а також у суміші з *SacI* утворює три аналогічних фрагменти — 6,5, 2,4 і 1,9 тис. п. н., що в сумі становить 10,8 тис. п. н.

Препарати ДНК 3 і 4 з верхньої зони гелю належать іншій і більшій плазміді — *pSG1912-2*. Вони також дають ідентичну картину рестрикції, що доводить їхнє спільне походження від більшої плазміді. Рестриктаза *BglII* викликає появу одного фрагмента ДНК розміром 19,5 тис. п. н. (доріжка 7, рис. 3 і доріжка 4, рис. 4). Рестриктази *PvuII* і *SacI* розщеплюють молекулу ДНК плазміді у трьох сайтах. Сума розмірів *PvuII*-фрагментів препаратів 3 і 4 становить 23,6 і 22,4 тис. п. н. відповідно, а така ж сума *SacI*-фрагментів — 24,2 і 22,4 тис. п. н., що свідчить про добре узгодження одержаних даних. Внаслідок подвійного перевару ДНК плазміді рестриктазами *SacI* і *KpnI* одержано шість фрагментів, сума розмірів яких дорівнює 22,5 тис. п. н. Таким чином, на підставі рестрикційного аналізу можна вважати, що плазміда *pSG1912-2* має розмір 22,4 тис. п. н.

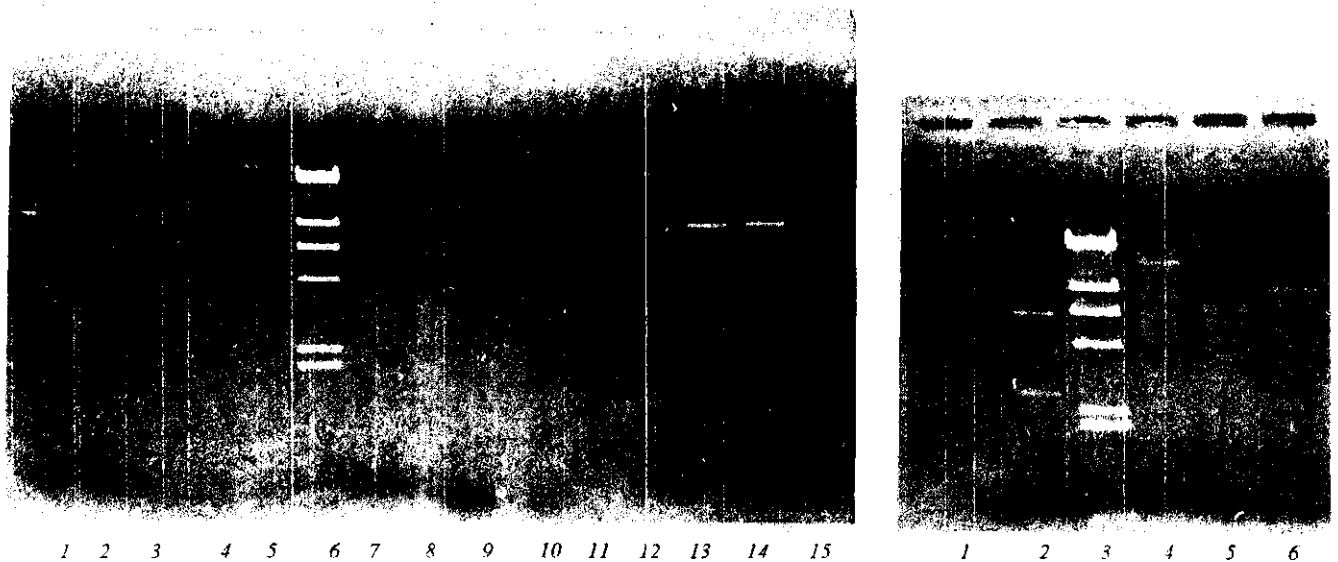


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз плазмід, оброблених рестриктазами: 1—5 — ДНК з нижньої смуги слабоспорулюючого і неспорулюючого штамів; 6 — ДНК фага дямбда + *HindIII*; 7—11 — ДНК з верхньої смуги споруючого штама; 12—15 — ДНК з нижньої смуги споруючого штама; Рестриктази: *BglII* — 1, 7, 9; *PvuI* — 2, 8, 13; *SacI* — 3, 9, 14; *KpnI* — 15; *SacI* + *KpnI* — 4, 10; контроль — 5, 11

Рис. 4. Електрофоретичний аналіз плазмід, оброблених рестриктазами: 1—2 — ДНК з нижньої смуги споруючого штама; 3 — ДНК фага дямбда + *HindIII*; 4—6 — суміш ДНК з нижньої зони слабоспорулюючого і неспорулюючого штамів; рестриктази: *BamHI* — 1, *KpnI* — 2; *BglII* — 4; *PvuII* — 5 і *SacI* — 6

Виходячи з інтенсивності смуг в агарозному гелі препаратів ДНК, виділених за методом Кайзера, можна вважати обидві плазмиди багатокопійними. Спроби елімінувати плазмиди за допомогою різних факторів (УФ опромінення спор і фрагментованого міцелію, їхня обробка бромистим етидієм і нітрозогуанідном та вирощування при підвищеній температурі) не дали позитивних результатів, що може вказувати на важливе значення обох плазмід для життєдіяльності клітин стрептоміцета. Плазмиди сумісні і мають деякі однакові за розмірами фрагменти після обробки рестриктазами *BamHI* і *KpnI*. Не виключена можливість, що вони споріднені і відносяться до однієї родини. Біологічна функція плазмід поки що залишається невизначеною.

Б. П. Мацелюх, В. В. Лукьянчук, Л. В. Полищук, А. Б. Мацелюх, Ю. Рор

Выделение и рестрикционный анализ двух плазмид *Streptomyces globisporus* 1912

Резюме

Из мицелия трех штаммов *Streptomyces globisporus* 1912, отличающихся интенсивностью споруляции и уровнем образования антибиотика ландомицина E, выделены две многокопийные плазмиды pSG1912-1 и pSG1912-2 размерами 10,3 и 22,4 тыс. пар нуклеотидов соответственно. Определено количество сайтов узнавания для рестриктаз *BglII*, *KpnI*, *PvuII* и *SacI* на молекулах ДНК плазмид.

B. P. Matselyukh, V. V. Lukyanchuk, L. V. Polishchuk, A. B. Matselyukh, J. Rohr

Isolation and restriction analysis of two plasmids from *Streptomyces globisporus* 1912

Summary

Two plasmids pSG1912-1 (10,3 kb) and pSG1912-2 (22,4 kb) were isolated from mycelium of three *Streptomyces globisporus* strains differing in the level of sporulation and landomycin E production. The number of restriction sites for endonucleases *BglII*, *KpnI*, *PvuII* and *SacI* was determined in both plasmid molecules.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Полищук Л. В., Дехтяренко Т. Д., Стефанишин Е. Е. и др. Плазмиды стрептомицетов глобиспориновой группы // Микробиол. журн.—1985.—47, № 4.—С. 83—88.
2. Стефанишин Е. Е., Дехтяренко Т. Д., Полищук Л. В. и др. Рестрикционный анализ плазмиды pSG1912 // Там же.—1986.—48, № 2.—С. 79—80.
3. Заверуха В. Б., Полевода Б. В., Полищук Л. В., Мацелюх Б. П. Клонирование фрагментов стрептомицетной плазмиды pSG1912 в составе вектора pUC19 // Там же.—1992.—54, № 5.—С. 30—34.
4. Полищук Л. В., Ганусевич І. І., Мацелюх Б. П. Вивчення протипухлинної дії антибіотиків, що продукуються *Streptomyces globisporus* 1912 на моделі карциноми Герена у щурів // Там же.—1996.—58, № 2.—С. 55—58.
5. Matselyukh B., Polishchuk L., Rohr J. Plasmid-induced synthesis of antibiotics in *Streptomyces* // Biol. Streptomycetes.—Ohrbeck, 1996.—P. 38.
6. Kieser T. Plasmid isolation by alkaline lysis (*Streptomyces* or *E. coli*): procedure 2 // Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual.—Norwich: The John Innes Found., 1985.—P. 85—92.
7. Rychlik W. Fast separations of plasmid DNA using discontinuous gradients in the preparative ultracentrifuge // Bio-Techniques.—1995.—18, N 1.—P. 90—92.
8. Маніаттис Т., Фреч Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—162 с.

Надійшла до редакції 14.07.97