

Association of polymorphic variants of growth hormone gene *GHI* with traits of cattle milk productivity was studied. Genotype association with total milk productivity was shown. The frequency of L and V alleles of *GHI* gene as well as the frequency of BLAD mutation was determined in different lines of Holstein and black-and white cattle in Belarusian sires population.

**ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р.,  
ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.**

*Институт биологии УНЦ РАН,*

*Россия, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 61, e-mail: tvmark@anrb.ru*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НОВОЙ ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ**

Известно, что в биоценозах, подвергающихся длительному воздействию синтетических химических соединений, формируются микроорганизмы, способные использовать молекулы ксенобиотиков в качестве источников питания и энергии. Генетические детерминанты, контролирующие катаболизм таких соединений часто располагаются на автономно реплицирующихся элементах (плазмидах), которые способны передаваться различным членам популяции, обеспечивая перестройку генофонда консорциума в целом. Генетический обмен между организмами может потенциально увеличивать способность популяции к выживанию и адаптации к техногенным факторам окружающей среды (Cohan, 1996).

Плазмиды согласно способности к переносу делятся на конъюгативные (самотрансмиссибельные) и мобилизуемые (трансмиссибельные в присутствии дополнительных конъюгационных факторов). Конъюгативные плазмиды - это, как правило, плазмиды большого размера, несущие набор генов (*tra*), кодирующих систему переноса и специфический сайт *oriT*, с которого начинается трансфер. Проблема переноса неконъюгативных плазмид, не обладающих набором *tra* генов, решается посредством генетических систем мобилизации. Перенос плазмид небольших размеров обеспечивается специфическими белками мобилизации, кодируемыми областью мобилизации (*mob*) и областью начала переноса (*oriT*). Как оказалось, именно мобилизуемые плазмиды имеют огромное значение в процессах поддержания и распространения экофизиологических признаков, в частности, способности к деградации современных ксенобиотиков.

Вместе с тем следует отметить, что анализ разнородности и разнообразия мобилизуемых плазмид проведен в меньшей степени, чем это сделано для конъюгативных плазмид. Поэтому исследования особенностей строения мобилизуемых плазмид, включая области репликации, становятся особенно актуальным. Изучение молекулярных структур мобилизуемых плазмид позволяет раскрыть особенности эволюции и установить филогенетические отношения среди членов различных таксонов штаммов-деструкторов. Привлечение ресурсов современных баз данных для изучения структурных особенностей генов мобилизации позволяет предложить их классификацию в семействах и подсемействах, а описание генетической организации каждого семейства, их характерных черт и отношений среди кодируемых ими белков определяет подход к характеристике глобального генного пула мобилизуемых плазмид.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования служила плаزمида рАН 36-4CPA штамма *Citrobacter hydrophyla* IBRB-36 4CPA, выделенного из образцов почв промзоны г. Уфы.

Плазмидную ДНК выделяли щелочным лизисом по методу Бирнбойма-Доли (Birnboim & Doly, 1979). Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с

использованием легкоплавкой агарозы и агаразы AgarACE («Promega», США) согласно рекомендациям производителя. PDRF- анализ препаратов ДНК выполняли электрофорезом в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В качестве маркеров использовали 1kb DNA ladder, 100bp DNA ladder («СибЭнзим», Россия), вектор pGEM-3Zf(+) (Promega, США). Документации результатов электрофоретического разделения препаратов ДНК осуществляли на системе BioDoc Analyze («Biometra», Германия).

Kzo9I -, RsaI - и AluI - рестрикционные фрагменты плазмиды pАН 36-4CPA были клонированы в сайтах BamHI и HindII полилинкера вектора pGEM-3Zf(+) («Promega», США). Для получения рекомбинантов использовали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5 $\alpha$ . Плазмидную ДНК рекомбинантов выделяли с использованием набора Wizard MaxiPreps («Promega», США), согласно рекомендациям производителя.

Автоматическое секвенирование последовательностей клонированных фрагментов плазмиды pАН 36-4CPA выполняли с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США), на приборе DNA Analyzes 3730, («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование выполнялось с применением универсальных плазмидных праймеров M13(F), M13(R).

Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов плазмиды pАН 36-4CPA редактировались с помощью программы BioEdit и выравнивались с использованием программы CLUSTALW v 1.75. [<http://www.genebee.msu.su/clustal>]. Скрининг сходства секвенированных последовательностей по базе данных GenBank проводили в программе BLASTA [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]

#### **Результаты и обсуждения.**

**Анализ плазмиды pАН 36-4CPA.** Из клеток природного штамма *Citrobacter hydrophila* IBRB-36-4CPA была изолирована плазида деградации хлорфеноксисукусных кислот, обозначенная нами pАН 36-4CPA. Составлена рестрикционная карта плазмиды по BamHI-, HincII- и PvuII-сайтам и определен ее размер.

С целью определения последовательности нуклеотидов pАН 36-4CPA была создана библиотека перекрывающихся рестрикционных фрагментов плазмиды. Для клонирования были выбраны эндонуклеазы: *RsaI*, *AluI* и *Kzo9I* и векторная плазида pGEM-3Zf(+).

По результатам рестрикционного анализа библиотеки *Kzo9I* было получено 18 рекомбинантных клонов, при этом клоны разделились на десять групп, содержащих соответственно: 5, 2, 2, 1, 1, 2, 1, 1, 1 и 2 клона.

Рестрикционный анализ *RsaI* – библиотеки выявил 12 клонов, которые составили шесть групп из 4, 1, 2, 1, 2 и 1 клона, соответственно.

Третья *AluI* – библиотека образовалась из 23 клонов, после рестрикции разделившихся на 9 групп из 4, 6, 1, 1, 3, 2, 1, 4 и 1 клона, соответственно.

Далее было проведено частичное секвенирование полученных клонов с внутренних плазмидных праймеров M13(F), M13(R), что позволило прочитать нуклеотидные последовательности вставок. В результате анализа полученных данных по трем библиотекам были выявлены 11 групп клонов с идентичными сиквенс-типами. Остальные 14 клонов представляли собой химерные артефакты и были исключены из дальнейшего рассмотрения.

Кроме того, в ходе дальнейшей работы секвенирование полученных клонов сочеталось с синтезом оригинальных праймеров с целью получения перекрывающихся последовательностей плазмидной ДНК. Для автосеквенирования в двух направлениях синтезировались как прямые, так и обратные праймеры.

**Характеристика структуры плазмиды рАН 36-4СРА.** Выравнивание полученных перекрывающихся нуклеотидных последовательностей позволило установить полную последовательность нуклеотидов плазмиды рАН 36-4СРА, размер которой составил 5217 п.н. и установить ее G+C состав - 50,74%.

**Анализ области репликации плазмиды рАН 36-4СРА.** Сравнение нуклеотидной последовательности плазмиды рАН 36-4СРА с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, позволило идентифицировать регион плазмиды рАН 36-4СРА с 142 по 875 п.н. как гомологичный областям репликации плазмид р26807, штамма *Yersinia enterocolitica* (AJ132618), р15А (V00309) и рColE1 (J01566), *E. coli*. Сходство нуклеотидной последовательности рАН 36-4СРА с р15А составило 84%, а с ColE1 - 71%. Наибольший уровень гомологии наблюдался с репликационным регионом плазмиды р26807 штамма *Yersinia enterocolitica* - 91%.

Все три плазмиды относятся к ColE1-типу плазмид, что дало возможность отнести рАН 36-4СРА к этому типу. Выявленная гомология позволила идентифицировать элементы, участвующие в репликации плазмиды рАН 36-4СРА. Установлено, что исследуемая плазида обладает репликационной системой, содержащей праймер РНК II (204-725 п.н.) и комплементарную праймеру регуляторную последовательность - РНК I (207-310). РНК II и РНК I определяют тип несовместимости плазмиды и ее копияность. Промоторы в регионах -35 и -10 для РНК I были полностью идентичны с промоторами плазмид р26807, р15А и рColE1, в то время как для РНК II наблюдалось некоторые отличия: в области -35 замена двух нуклеотидов и вставка одного, в позиции -10 замена трех нуклеотидов.

Точка начала репликации *oriV* исследуемой плазмиды локализована в позиции 726 п.н. и оказалась на 100% идентичной последовательностям *oriV* р26807, р15А и рColE1.

Ранее было показано, что плазида ColE1 обладает еще одним фактором, участвующим в контроле репликации - ROM белком (Chan et al., 1985). На основе анализа последовательности рАН 36-4СРА был сделан вывод, что ROM белок плазмидой рАН 36-4СРА не кодируется.

**Регион мобилизации плазмиды рАН 36-4СРА.** Предварительный скрининг нуклеотидных последовательностей секвенированной плазмиды рАН 36-4СРА по базе данных GenBank выявил принадлежность фрагмента последовательности (1139-2948 п.н.) к семейству генов *mob* (кластер генов мобилизации).

Была выявлена высокая гомология *mob* - региона плазмиды рАН 36-4СРА, длина которого составила 1809 п.н., с плазидами рЕСО1 *Enterobacter cloacae* - 99%, рАН3680 *Aeromonas hydrophila* - 99%, рЕС278 *Escherichia coli* 278В - 98%, рК *Salmonella enteritidis* - 90%, рBERT *Salmonella berta* - 90%.

Сравнение последовательностей показало, что область мобилизации плазмид рАН 36-4СРА и рЕСО1 имеют сходную структуру и объединяет 4 гена *mobA*, *mobB*, *mobC* и *mobD*. Анализ расположения последовательностей открытых рамок считывания позволил установить, что размер гена *mobA* рАН 36-4СРА составляет 1497 п.н., *mobB* - 489 п.н., *mobD* - 216 п.н., *mobC* - 324 п.н. Два гена (*mobB* и *mobD*) полностью перекрываются последовательностью гена *mobA*, в то время как ген *mobC* перекрывается геном *mobA* только частично (11 п.н.).

#### **Выводы**

Определена последовательность нуклеотидов плазмиды рАН 36-4СРА.

Выявлена гомология исследуемой плазмиды с репликационными регионами плазмид р26807, р15А и рColE1, что позволила отнести рАН 36-4СРА к ColE1-типу плазмид. Идентифицированы элементы, участвующие в репликации плазмиды рАН 36-4СРА, а именно: РНК II, РНК I, *oriV*, отсутствие *rom* гена.

Установлена гомология нуклеотидной последовательности плазмиды рАН 36-4СРА с кластером *mob* генов плазмиды рЕСО1 штамма *Enterobacter cloacae*. Выявлено, что

гены *mobB* и *mobD* полностью перекрываются с последовательностью гена *mobA*, в то время как ген *mobC* перекрывается геном *mobA* только частично (11 п.н.). Определены размеры генов мобилизации плазмиды рАН 36-4СРА: *mobA* рАН 36-4СРА составляет 1497 п.н., *mobB* - 489 п.н., *mobD* - 216 п.н., *mobC* – 324 п.н.

#### Литература

1. Cohan F.M. The role of genetic exchange in bacterial evolution // ASM News. - 1996.- vol. 62. - P. 631-636.
2. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids. Res. - 1979. - vol. 7. - P. 1513-1523.
3. Chan P.T, Ohmori H., Tomizawa J., Lebowitz J. Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA // The Journal of Biological Chemistry. - 1985. - vol. 260. - P.8925-8935.

#### Резюме

Новая плазида деградації ксенобіотиків, була виділена із штамма *Citrobacter hydrophila* IBRB-36-4СРА. Довжина плазмиди становить 5217 п.н. Реплікаційний регіон плазмиди рАН 36-4СРА гомологічний репліконам ColE1-типу і кодує послідовності РНКІ і РНКІІ. Плазида містить чотири гени мобілізації *mobCABD*. Послідовності генів *mobB* і *mobD* перекриваються геном *mobA*.

A new D-plasmid рАН 36-4СРА with a size of 5217 bp had been isolated from the *Citrobacter hydrophila* strain IBRB-36-4СРА. The origin of replication of рАН 36-4СРА homologous to ColE1-type plasmid. The replication region of the plasmid encodes a primer RNAI and countertranscript RNAII. The plasmid рАН 36-4СРА consists of four mobilization genes, *mobCABD*. The *mobB* and *mobD* genes entirely overlap with the *mobA* gene.

**ЗЛАЦЬКА А.В., КОРОЛЬ Л.В., ШИТКОВА Ю.В., ШЕРЕПІТКО Д.В.**

Український інститут експертизи сортів рослин,

Україна, 03041 Київ, вул. Генерала Родимцева 15, e-mail: zlatska@hotmail.com

### ПЕРЕВІРКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ISSR-МАРКЕРІВ У ВИВЧЕННІ ГЕНОМУ БУРЯКА ЦУКРОВОГО

Цукровий буряк – є однією з найбільш поширених сільськогосподарських культур, основними напрямками використання якої є виробництво цукру та спирту, в зв'язку з чим, врожайність (врожай коренеплодів), якість (вміст сахарози і чистота соку) та стійкість до хвороб є основними господарсько цінними ознаками, на які в першу чергу звертає увагу селекціонер при створенні нових ліній та гібридів, оскільки саме вони формують економічний внесок у ефективність виробництва цукру та продуктів його переробки [1]. Сучасний рівень ефективною та інтенсивною селекції будь-якої сільськогосподарської культури не можливо уявити без залучення молекулярно-генетичних методів, а особливо молекулярно-генетичних маркерів, оскільки вони, на відміну від морфологічних ознак-маркерів, перекривають весь геном рослини, а їх прояв не залежить від впливу на рослину умов оточуючого середовища в процесі її росту та розвитку.

Проведений аналіз літературних джерел свідчить про відносно невелику кількість статей, присвячених питанню використання молекулярно-генетичних маркерів (як білкових, так і ДНК-маркерів) в аналізі геному буряка цукрового в порівнянні з іншими сільськогосподарськими культурами: ячмінь, пшениця, кукурудза, соя тощо. Усі ці напрямки зводилися до наступних: