

УДК 577.113.3:579.25:579.873.7:633.15

НУКЛЕОТИДНА ПОСЛІДОВНІСТЬ ФРАГМЕНТІВ ПЛАЗМІДИ pSS27

В.В. ЛУК'ЯНЧУК, Л.В. ПОЛІЩУК, Б.П. МАЦЕЛЮХ

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного, НАН України, Україна, 03143, Київ, вул. академіка Заболотного, 154
e-mail: vitaly@serv.imv.kiev.ua

Виявлено значну гомологію (92 %) просеквенованих стрептоміцетних послідовностей плазмід pSRL13, pSRL16 (F-праймер) та pSW49 (R-праймер) з послідовностями хромосомних генів білків споруючії *Streptomyces coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680. Також встановлено їхню гомологію (73 %) з послідовностями TraA-генів кількох стрептоміцетних плазмід (pJV1, pSLS і pSN22). Нуклеотидні послідовності плазмід pSS27, що клоновані в гібридних плазмідах pSRL13, pSRL16 (F-праймер) та pSW49 (R-праймер), є гомологічними між собою.

Ключові слова: стрептоміцет, плазміда, нуклеотидна послідовність.

Вступ. На даний час повідомлено, що встановлено повну нуклеотидну послідовність майже 1300 хромосомних ДНК мікроорганізмів у тому числі і 3 стрептоміцетних – *S. avermitilis* MA-4680, *Streptomyces coelicolor* A3(2) та *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350 [1, 2].

Також велика увага приділяється встановленню нуклеотидної послідовності позахромосомних ДНК. На початок 2008 року визначено повну нуклеотидну послідовність більш ніж 1200 плазмід мікроорганізмів, що належать до різних родин. Повну нуклеотидну послідовність встановлено для 22 плазмід стрептоміцетів [1, 2].

Відомо, що плазміди стрептоміцетів поряд із генами, необхідними для своєї реплікації, передачі та розповсюдження, можуть містити і гени, що надають клітині-господарю ряд властивостей (наприклад, синтез антибіотика метиленоміцину детермінується плазмідами SCP1 і pSV1, плазміда pST4 детермінує РНК-метиразу, що забезпечує клітину стійкістю до стрептоміцину-лінкоміцину-спіраміцину) [3, 4].

Базуючись на даних секвенування плазмідних ДНК, виявлено детермінацію плазмідами ряду ферментів (наприклад, ендо- і екзонуклеаз, лігази, полікетидсинтаз I типу, дегідрогеназ), білків мембран та ряду інших метаболітів [1, 2]. Плазмід SCP1, SCP2 і SLP2 повідомляється про кодування ними білків, що беруть участь в утворенні повітряного міцелію і спор [5–7].

© В.В. ЛУК'ЯНЧУК, Л.В. ПОЛІЩУК, Б.П. МАЦЕЛЮХ, 2008

Таким чином, визначення послідовності ДНК має важливе значення як для дослідження всіх фундаментальних біологічних процесів, так і для встановлення таксономічних зв'язків мікроорганізмів, генно-інженерних та біотехнологічних розробок.

Метою даної роботи було встановлення нуклеотидної послідовності низки фрагментів стрептоміцетної плазмід рSS27, клонованих раніше в біфункціональному векторі рWHM4.

Матеріали і методи

У роботі досліджували плазмідні ДНК ряду трансформантів *Escherichia coli* [8] (табл. 1).

В експериментах використовували середовища МПА та МПБ, які містили ампіцилін у концентрації 100 мкг/мл.

Плазмідну ДНК з клітин трансформантів отримували за методикою Kieser [9]. Електрофорез плазмідної ДНК проводили в 0,8 % агарозі в ТБЕ-буфері [10].

Визначення нуклеотидних послідовностей проводили на секвенаторі CEQ2000XL "Beckman". Секвенування проводили з використанням пари праймерів:

F-праймер 5'-GTAAAACGACCGCCAGT-3'
R-праймер 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'.

Результати та обговорення

З літературних джерел відомо, що завдяки наявності плазмідної ДНК

клітина стрептоміцету може отримати здатність продукувати ряд біологічно активних речовин, таких як антибіотики, пігменти і амінокислоти, набути стійкість до токсичних речовин та ряд інших життєво важливих властивостей [5, 11, 12].

Штам *Streptomyces sp. 27* було виділено із зразка ґрунту Київської обл. в 1995 р. У результаті досліджень його фізіологічних та морфологічних властивостей було встановлено, що штам є продуцентом ендонуклеази II типу Ssp27 та містить плазмідну рSS27 (13,7 ± 0,2 тпн) [8].

На базі векторів рBluescriptII SK(+) та рWHM4 створено банк фрагментів стрептоміцетної плазмід рSS27. Відібрані трансформанти містили гібридні молекули ДНК зі вставками ДНК стрептоміцетної плазмід рSS27 від 0,5 тпн до 12,3 тпн [8]. Відомо, що індивідуальні гени складають лише незначну частину банку клонованих послідовностей. Як встановлено, в складі векторної плазмід рWHM4 прокловано як послідовності ДНК плазмід рSS27, що обмежені сайтами впізнавання рестриктази Pst1, так і такі, що мають один чи більше сайтів рестрикції для даного ферменту всередині проклованого фрагмента [8]. Проведено секвенування фрагментів ДНК плазмід рSS27, які були включені до складу 11 гібридних плазмід. Розміри визначені

Таблиця 1. Трансформанти *E. coli* та їхні гібридні плазмід

Трансформанти	Умови конструювання плазмід
SRL13 (pSRL13); SRL14 (pSRL14); SRL15 (pSRL15); SRL16 (pSRL16); SRL17 (pSRL17); SRL19 (pSRL19); SRL22 (pSRL22); SRL23 (pSRL23)	вектор: рBluescript II SK (+) (2,9 тпн). ендонуклеаза: Bsp120I*. реципієнт: <i>E. coli</i> DH1.
SW49 (pSW49); SW51 (pSW51)	вектор: рWHM4 (6,6 тпн). ендонуклеаза: PstI*. реципієнт: <i>E. coli</i> JM109.

Примітка: * – частковий гідроліз плазмід рSS27.

1	ccggcacgtg	ataatcgacg	ccatgatgta	tacgactcac	tatagggcga	ttgggtaccg
61	ggcccagttc	atgaccggct	gctgcggctt	ccgggcgcgg	ggttgatctc	ggttgatctc
121	ttcctcgta	tcctgctgga	acgagggcga	ggcagcggca	gcgttcttcg	cggcgtcccg
181	cagagcgtcg	cgtctgctgc	ntctgcggcg	acctctgcgc	gcgatgcgga	gcgacgcacg
241	ccctcgggtc	ggcacgcggg	agencgctct	gcaggatctc	gctgcatcgc	gaactcgatg
301	gagagcgtca	cgcccgcggc	ccgcagggtg	ttgcagtagt	tccgcacctg	cgcggggaca
361	agaactcggc	gagggcagag	cgactgcacg	acgcccgcgg	ggcggcgggc	ctgcctgttg
421	tgccctacg	tgaccgcgga	gagcgcacca	gccccacga	acgccgcgcg	cccacgtggc
481	aactgtgtcc	cgtctgctcc	tgtctgtggc	atgctganct	cgttgctctt	tcgtncgccc
541	tcgtncgccc	tgcgtacggc	agcggaaac	gacgtacgat	cttcttgac	cgcgtt

Рис. 1. Нуклеотидна послідовність фрагмента плазмиди рSS27 {гібридна плазміда рSRL13 (R-праймер)}

Таблиця 2. Визначення нуклетидної послідовності фрагментів стрептоміцетної плазмиди рSS27

Гібридні плазмиди та їхні молекулярні розміри	Розміри просіквенованих фрагментів гібридних плазмід	
	F-праймер	R-праймер
рSRL13 (12,0 тпн)	596	581
рSRL14 (4,4 тпн)	668	590
рSRL15 (4,4 тпн)	747	648
рSRL16 (7,0 тпн)	761	1034
рSRL17 (6,0 тпн)	725	630
рSRL19 (10,5 тпн)	684	718
рSRL22 (4,0 тпн)	Н	352
рSRL23 (7,0 тпн)	181	Н
рSW49 (8,0 тпн)	694	800
рSW41 (18,0 тпн)	590	401

Примітка: Н – визначення не проведено.

них нуклеотидних послідовностей становили від 352 до 1034 пн (рис. 1, табл. 2).

Порівняння визначених нуклеотидних послідовностей проклованих фрагментів плазмиди рSS27 з Інтернет-базами даних GenBank та EMBL, які містять інформацію про визначені нуклеотидні послідовності, дозволили виявити високу тотожність її з низкою генів стрептоміцетів (як хромосомних, так і плазмідних), які детермінують білки з різними функціями [1, 2].

Для просіквенованої частини послідовності плазмиди рSW49 (F-прай-

мер) виявлена гомологія в більш ніж в 85 % з послідовностями ДНК низки стрептоміцетів: *S. coelicolor* A3(2), *S. avermitilis* MA-4680 та *S. phaeochromogenes*. Встановлена гомологія 86 % – 92 % послідовностей цього фрагмента плазмиди рSS27 з послідовностями білків (хромосомні гени), які беруть участь у споруляції *S. coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680 відповідно і гомологія в 92 % послідовності цього фрагмента з плазмидою рJV1 *S. phaeochromogenes* [8]. Було виявлено гомологію (до 67 %) з послідовностями плазмід рSLS (*S. lauterentii*), рSN22

(*S. flavovirens*) та рRL1 (*S. sp.* 44030). Так гомологічними виявилися гени перенесення TraBSL плазмід рSLS та TraB плазмід рRL1 [1, 2]. Подальші наші дослідження також виявили значну гомологію (до 92 %) просеквенованих стрептоміцетних послідовностей гібридних плазмід рSRL13, рSRL16 (F-праймер) та рSW49 (R-праймер) з послідовностями хромосомних генів білків споруючії *S. coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680 тих же кластерів, що і послідовність плазмід рSW49 (F-праймер).

Було виявлено гомологію (до 73 %) секвенованих послідовностей плазмід рSRL16 (F-праймер) та рSW49 (R-праймер) з послідовностями плазмід рJV1, рSLS і рSN22. Для послідовностей даних фрагментів плазмід рSS27 виявлено гомологію до послідовностей TraA-генів вище означених плазмід [1, 2]. У той час як для першої просеквенованої послідовності плазмід рSW49 (F-праймер) встановлено гомологію в 92 % з нуклеотидною послідовністю гена TraB плазмід рJV1 *S. phaeochromogenes* [8].

З даних літератури відомо, що у штама *S. coelicolor* A3(2) білки, які забезпечують утворення повітряного міцелію та спор детермінуються генами, локалізованими на хромосомі та плазмідах SCP1 та SCP2 [1, 2, 5, 6]. Необхідно підкреслити, що не виявлено гомології нуклеотидної будови у вищезгаданих генів. Цікавим є той факт, що нами виявлено гомологію нуклеотидної послідовності плазмід рSS27 з локалізованими на хромосомі *S. coelicolor* A3(2) генами, які детермінують білки споруючії.

В літературі є повідомлення про гомологічність нуклеотидних послідовностей плазмідних і хромосомних генів клітини-господаря. Такі гени можуть

детермінувати властивості, що є важливими для носія. Наприклад, у штамі *S. cattleya* знайдено плазмід, що містить ген аргінінсуцинат синтетази, який гібридизується з аналогічними генами стрептоміцетів [13]. Зі штаму *S. rimosus* SRP2 було виділено плазмід SRP2', яка містила ген стійкості до окситетрацикліну, послідовність якого гомологічна з хромосомним геном стійкості [14]. Висловлено припущення, що прим-форма плазмід SRP2 утворилася при ексцизії плазмід з хромосоми. Загальновідома прим-форма плазмід *S. coelicolor* SCP1'-cysB, яка утворюється після кон'югаційного перенесення [15].

На підставі наших даних, можна зробити припущення, що штам *Streptomyces sp.* 27 є таксономічно близьким *S. coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680, а фрагменти плазмід рSS27, що проклоновані в гібридних плазмідах рSW49, рSRL13 та рSRL16, походять з хромосоми носія.

Як було встановлено, три визначені нуклеотидні послідовності плазмід рSS27, які містяться в гібридних плазмідах рSRL13, рSRL16 (F-праймер) та рSW49 (R-праймер), є гомологічними між собою (рис. 2). Як вказувалося раніше, при конструюванні плазмід рSRL13 та рSRL16 використовували рестриктазу Bsp120I, в той час як для створення плазмід рSW49 застосували ендонуклеазу PstI. Вірогідно, що "зсув" у розташуванні послідовності плазмід рSW49 (R-праймер) на схемі є наслідком того, що клонування проведено в цьому випадку з використанням ендонуклеази PstI. Крім того, виявлено різницю в напрямках розташування клонованих стрептоміцетних фрагментів у гібридних плазмідах рSRL13 та рSRL16 щодо такого плазмід рSW49. Таким чином, у плазмідах

pSRL13, pSRL16 та pSW49 було прокловано фрагменти плазмиди pSS27 різних розмірів, які розташовуються на одному і тому ж сегменті молекули стрептоміцетної плазмиди pSS27.

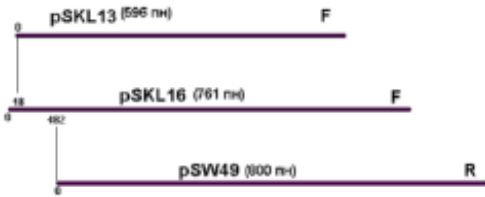


Рис. 2. Гомологія секвенованих фрагментів гібридних плазмід pSRL13, pSRL16 та pSW49

Висновки

В гібридних плазмідах pSRL13, pSRL16 та pSW49 було прокловано фрагменти плазмиди pSS27 різних молекулярних розмірів, які проте розташовуються на одному і тому ж сегменті молекули стрептоміцетної плазмиди pSS27. Встановлено значну гомологію (до 92 %) нуклеотидної послідовності фрагмента плазмиди pSS27, який входить до складу гібридних плазмід pSRL13, pSRL16 та pSW49 із послідовностями низки генів стрептоміцетів (як хромосомних, так і плазмідних), що детермінують білки з різними функціями.

Перелік літератури

1. Інтернет-база даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).
2. Інтернет-база даних EMBL (www.ebi.ac.uk/embl.html).
3. Kinashi H., Shimaji M., Sakai A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes // *Nature*, London. – 1987. – Vol. 328, № 6129. – P. 454–456.
4. Lin C., Xue Y. Plasmid characteristics of thermophilic *Streptomyces* // *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*. Proceeding of the Sixth International Symposium on Actino-

mycetes Biology, (Szabo G., Biro S., Goodfellow M, eds), Academiai Kiado, Budapest. – 1986. – В. – P.606.

5. 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. – Vol. 417, №6885. – P. 141–147.
6. Huang C., Chen C., Tsai H., Chen C., Lin Y., Chen C.W. Linear plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a composite replicon // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 47, №6. – P. 1563–1576.
7. Kataoka M., Kiyose Y.M., Michisuji Y., Horiguchi T., Seki T., Yoshida T. Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces nigrifaciens* plasmid, pSN22: genetic organization and correlation with genetic properties // *Plasmid*. – 1994. – Vol. 32, №1. – P. 55–69.
8. Лук'янчук В.В., Поліщук Л.В., Мацелюх Б.П. Дослідження стрептоміцетної плазмиди pSS27 // *Мікроб. журн.* – 2006. – Vol. 68, №5. – С. 20–25.
9. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // *Plasmid*. – 1984. – Vol. 12, №1. – P. 19–36.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – Москва: Мир, 1984. – 450 с.
11. MacNeil T., Gibbons P.H. Characterization of the *Streptomyces* plasmid pVE1 // *Plasmid*. – 1986. – Vol. 16, № 3. – P. 182–194.
12. Thompson C.J., Ward J.M., Hopwood D.A. Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in *Streptomyces* // *J. Bacteriol.* – 1982. – Vol. 15, №2. – P. 668–677.
13. Usdin K., Christians K.M., De Wet C., Potgieter T.D., Shaw C.B., Kirby R. The loss of a large DNA fragment is associated with an aerial mycelium negative (Amy⁻) phenotype of *Streptomyces cattleya* // *J. Gen. Microbiol.* – 1985. – Vol. 131, №2. – P. 979–981.
14. Rhodes P.M., Hunter I.S., Friend E.J., Warren M. Recombinant DNA method for

the oxytetracycline producer *Streptomyces rimosus* // Biochemical Society Transaction. – 1984. – №12. – P. 586–587.

15. Hopwood D.A., Wright H.M. Genetic studies on SCP1–prime strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Gen. Microbiol. – 1976. – Vol. 95, №1. – P. 107–120.

Представлено Ф.І. Товкачем
Надійшла 19.05.2008

ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЛАЗМИДЫ рSS27

В.В. Лукьянчук, Л.В. Полищук,
Б.П. Мацелюх

Ин-т микробиологии и вирусологии НАН
Украины
Украина, 03143, Киев, ул. Академика
Заболотного, 154
e-mail: vitaly@serv.imv.kiev.ua

Обнаружена значительная гомология (до 92%) стрептомицетных последовательностей гибридных плазмид рSRL13, рSRL16 (F-праймер) и рSW49 (R-праймер) с последовательностями хромосомных генов белков споруляции *Streptomyces coelicolor* A3(2) и *S. avermitilis* MA-4680. Также установлено их гомологию (73%) с последовательностями TraA-генов ряда

стрептомицетных плазмид (рJV1, рSLS и рSN22). Нуклеотидные последовательности плазмиды рSS27, клонированные в гибридных плаزمидах рSRL13, рSRL16 (F-праймер) и рSW49 (R-праймер), гомологичны между собой.

Ключевые слова: стрептомицет, плазмида, нуклеотидная последовательность.

RESEACH OF NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PLASMID рSS27

V.V. Lukyanchuk, L.V. Polishchuk,
B.P. Matselyukh

Int. of Microbiology and Virology NASU
Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotny st., 154
e-mail: vitaly@serv.imv.kiev.ua

It was found significant homology (up to 92%) of *Streptomyces* sequences of hybrid plasmid рSRL13, рSRL16 (F-primer) and рSW49 (R-primer) with ones of genes for sporulation protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *S. avermitilis* MA-4680 chromosomes. Also it is established them homology (73 %) with sequences of TraA-genes some *Streptomyces* plasmids (рJV1, рSLS and рSN22). Homology one to others of sequences of plasmid рSS27 which were maintained in hybrid plasmids рSRL13, рSRL16 (F-primer) and рSW49 (R- primer) was established.

Key words: *Streptomyces*. plasmid, nucleotide sequence.