

Ж. Ю. Сергеева, Ф. И. Товкач

Рестрикционное картирование внехромосомного элемента рСА25 *Erwinia carotovora*

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. Г. Скрипалем)

Проведено фізичне картування позахромосомного елемента рСА25 *Erwinia carotovora* і його транспозонного варіанта рСА25::Тn9. Плазміда рСА25 належить до найбільш поширеного серед ервіній розмірного класу позахромосомних ДНК завдовжки 9,8 т. п. н. На основі отриманих даних побудовано попередню рестрикційну карту плазміди і виявлено місце вбудовування транспозону Тn9 у плазмідну ДНК.

Внехромосомные ДНК достаточно широко распространены у фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*. В своем большинстве плазмиды *E. carotovora* являются криптоически из-за отсутствия данных относительно их физиологических функций и роли в экологии этой бактерии [1]. Плазмиды размером 9,8 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) и их делеционно-вставочные варианты представляют собой наиболее распространенную группу внехромосомных элементов, выявленных у *E. carotovora*. Рестрикционный анализ этих внехромосомных ДНК с помощью эндонуклеаз *HpaI* и *EcoRV* показал, что они гомологичны по сайтам рестрикции. Одним из наиболее изученных генетических элементов бактерии *E. carotovora*, размером 9,8 т. п. н., является плазмида рСА25 [2].

В рамках проведенного исследования с целью создания физической карты сайтов мы осуществили рестрикционное картирование плазмиды рСА25 *E. carotovora* и ее транспозонного варианта рСА25::Тn9 [3]. В нашу задачу входило также определение взаимного расположения сайтов рестрикции и области встраивания транспозона Тn9 в молекулу плазмидной ДНК. В работе были использованы штаммы *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48А (рСА25) и *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48А 7/4b (рСА25::Тn9).

Выделение плазмид из клеток *E. carotovora* проводили щелочным методом [4]. Полученные плазмидные ДНК осаждали этанолом и растворяли в воде или в буфере Т: 10 мМ трис-НСl, рН 7,8. Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы *HpaI*, *BglI*, *EcoRI*, *EcoRV* и *PstI*. Состав рестрикционной смеси был следующий: 5 мкл плазмидного образца, 2 мкл соответствующего 10-кратного буфера для рестрикции, 1 мкл эндонуклеазы и 12 мкл Н₂О. Время рестрикции составляло 2–3 ч при 37°С. Фрагменты разделяли в 0,9–1,2% агарозных гелях. В качестве маркера размера использовали фрагменты ДНК фага λ, полученные с помощью эндонуклеаз *HindIII* и *PstI*.

В результате проведения рестрикционного анализа с использованием эндонуклеаз *HpaI*, *BglI*, *EcoRI*, *EcoRV* и *PstI* мы обнаружили, что ДНК нативной плазмиды рСА25 не содержит сайтов для *PstI* и *EcoRI*. Для фермента *BglI* на ней имеется только один сайт, а для *HpaI* и *EcoRV* — по три сайта. После рестрикции *HpaI* обнаруживается один большой фрагмент размером 9,2 т. п. н. и два небольших фрагмента — 0,4 и 0,2 т. п. н. (рис. 1, трек 3). При гидролизе ДНК эндонуклеазой *EcoRV* обнаруживается два близких по размеру фрагмента — 4,7 и 4,5 т. п. н. и один небольшой фрагмент — 0,65 т. п. н.

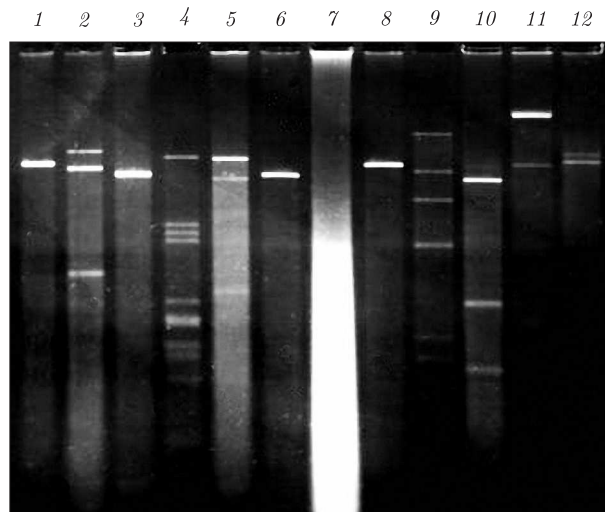


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов рестрикции плазмиды pCA25 *E. carotovora* subsp. *carotovora* и транспозонного варианта pCA25::Tn9: 1 – pCA25/BglI + EcoRI; 2 – pCA25::Tn9/BglI + EcoRI; 3 – pCA25/EcoRI + HpaI; 4 – λ /PstI; 5 – pCA25::Tn9/EcoRI + HpaI; 6 – pCA25/HpaI + BglI; 7 – pCA25::Tn9/HpaI + BglI; 8 – pCA25/BglI + PstI; 9 – λ /HindIII; 10 – pCA25::Tn9/BglI + PstI; 11 – pCA25/EcoRI + PstI; 12 – pCA25::Tn9/EcoRI + PstI

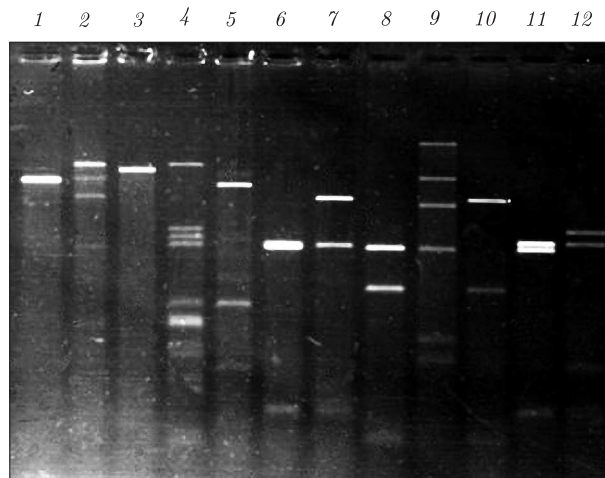


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов рестрикции плазмиды pCA25 *E. carotovora* subsp. *carotovora* и транспозонного варианта pCA25::Tn9: 1 – pCA25/HpaI + PstI; 2 – pCA25::Tn9/HpaI + PstI; 3 – pCA25/BglI + EcoRI + PstI; 4 – λ /PstI; 5 – pCA25::Tn9/BglI + EcoRI + PstI; 6 – pCA25/EcoRV + BglI; 7 – pCA25::Tn9/EcoRV + BglI; 8 – pCA25/EcoRV + HpaI; 9 – λ /HindIII; 10 – pCA25::Tn9/EcoRV + HpaI; 11 – pCA25/EcoRV + EcoRI; 12 – pCA25::Tn9/EcoRV + EcoRI

Анализ продуктов совместного гидролиза плазмидной ДНК рестриктазами *HpaI* и *BglI* показал, что сайт для *BglI* расположен в пределах фрагмента В (0,4 т. п. н.) *HpaI* (см. рис. 1, трек 6). При этом вместо фрагмента В обнаруживается два фрагмента — 0,25 и 0,15 т. п. н. Картина совместного гидролиза *EcoRV* + *BglI* дает основание предполагать, что сайт для *BglI* расположен в пределах фрагмента А (4,7 т. п. н.) *EcoRV* (рис. 2, трек 6). Вследствие этой рестрикции размер фрагмента А уменьшается до 4,55 т. п. н. и должен обнаруживаться четвертый фрагмент D — 0,15 т. п. н. (табл. 1). Но фрагмент с такой низкой молекулярной

массой при использованных нами условиях проведения электрофореза выходит за пределы геля. При двойном гидролизе ДНК эндонуклеазами *EcoRV* и *HpaI* должны образовываться шесть фрагментов, так как для каждой из двух эндонуклеаз на плазмиде имеется по три сайта. При этом размер фрагмента В *EcoRV* (4,5 т. п. н.) не изменяется (см. рис. 2, трек 8), а размеры фрагментов А и С уменьшаются до 4,55 и 0,45 т. п. н. соответственно (см. табл. 1). Три других фрагмента не могут быть обнаружены на данном геле по тем же причинам, что и фрагмент D *EcoRV* + *BglI*.

Рестрикционный анализ ДНК плазмиды рСА25::Tn9 тем же набором рестриктаз, что и плазмиды рСА25, позволил выявить область встраивания транспозона Tn9 в плазмидную ДНК и уточнить положение сайтов рестрикции для плазмиды рСА25. Установлено, что транспозон Tn9 встраивается в ДНК плазмиды рСА25 в фрагмент В *EcoRV* [2], при этом его размер увеличивается до 6,7 т. п. н., а также в фрагмент А *HpaI*, размер которого увеличивается примерно до 11,4 т. п. н.

Совместный гидролиз плазмиды рСА25::Tn9 рестриктазами *BglI* и *EcoRI* (см. рис. 1, трек 2) дает два фрагмента — 10,3 и 2,5 т. п. н. (см. табл. 1). Так как на транспозоне Tn9 имеется один сайт для рестриктазы *EcoRI* (расположенный в гене хлорамфениколацетилтрансферазы), то в результате рестрикции рСА25::Tn9 эндонуклеазами *EcoRI* + *HpaI* образуются четыре фрагмента. При сравнении их с фрагментами *HpaI* для плазмиды рСА25 (см. табл. 1) обнаруживается, что размер фрагмента А *HpaI* стал 8,9 т. п. н. и появился четвертый фрагмент D размером 3,0 т. п. н. То же происходит и при рестрикции рСА25::Tn9 рестриктазами *HpaI* + *BglI*: размер фрагмента А увеличивается на размер транспозона, что составляет примерно 2,2 т. п. н. (см. табл. 1).

Кроме сайта для рестриктазы *EcoRI*, на транспозоне Tn9 имеются также два сайта для рестриктазы *PstI*, расположенные в пределах IS1 последовательностей. Поэтому при двойном гидролизе ДНК *BglI* и *PstI* обнаруживаются три фрагмента плазмидной ДНК (см. рис. 1, трек 10). Их размеры составляют 8,3, 2,7 и 1,7 т. п. н. соответственно (см. табл. 1).

При обработке плазмиды рСА25::Tn9 одновременно рестриктазами *EcoRI* и *PstI* (см. рис. 1, трек 12) происходит вырезание транспозона Tn9 из плазмиды рСА25 по сайтам *PstI*, а также разрезание самого транспозона по сайту *EcoRI*. Размер плазмиды после вырезания транспозона отличается от исходного (9,8 т. п. н.) и составляет приблизительно 10,5 т. п. н. Мы объясняем это следующим образом. Транспозон Tn9 в ДНК фага P1 состоит из двух копий, расположенных в тандемной ориентации [5, 6]. Целостность этой структуры сохра-

Таблица 1. Размеры фрагментов А, В, С, D рестрикции ДНК, полученные при гидролизе плазмид рСА25 и рСА25::Tn9

| Вариант гидролиза | Плаزمида рСА25 | | | | Плазмида рСА25::Tn9 | | | |
|--|----------------|------|------|------|---------------------|------|------|------|
| | А | В | С | Д | А | В | С | Д |
| <i>BglI</i> + <i>EcoRI</i> | 9,8 | — | — | — | 10,3 | 2,5 | — | — |
| <i>EcoRI</i> + <i>HpaI</i> | 9,2 | 0,4 | 0,2 | — | 8,9 | 0,4 | 0,2 | 3,0 |
| <i>HpaI</i> + <i>BglI</i> | 9,2 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 11,4 | 0,35 | 0,2 | 0,15 |
| <i>BglI</i> + <i>PstI</i> | 9,8 | — | — | — | 8,3 | 2,7 | 1,7 | — |
| <i>EcoRI</i> + <i>PstI</i> | — | — | — | — | 10,5 | — | — | — |
| <i>HpaI</i> + <i>PstI</i> | 9,2 | 0,4 | 0,2 | — | 8,8 | 6,8 | 4,3 | — |
| <i>BglI</i> + <i>EcoRI</i> + <i>PstI</i> | 9,8 | — | — | — | 7,9 | 2,7 | 1,9 | — |
| <i>EcoRV</i> + <i>BglI</i> | 4,55 | 4,5 | 0,65 | 0,15 | 4,5 | 7,1 | 0,65 | 0,15 |
| <i>EcoRV</i> + <i>HpaI</i> | 3,2 | 4,5 | 0,45 | — | 3,2 | 7,1 | 0,45 | — |
| <i>EcoRV</i> + <i>EcoRI</i> | 4,7 | 4,5 | 0,65 | — | 4,7 | 5,3 | 0,65 | 1,85 |

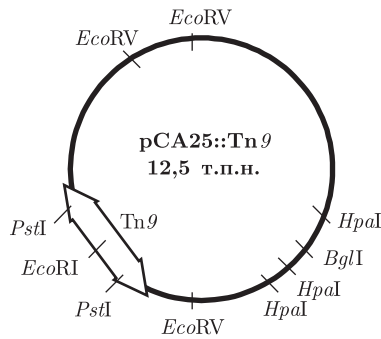


Рис. 3. Рестрикционная карта плазмиды pCA25::Tn9

няется после ее транспозиции в плазмиду pCA25 [2]. Размер вставки в составе плазмиды pCA25::Tn9, определенный на основе рестрикционного анализа, в среднем составляет от 2,2 до 3,8 т. п. н. Таким образом, изменение размера плазмиды pCA25 мы объясняем неполным вырезанием тандемной структуры транспозона Tn9 из ее ДНК.

После совместной рестрикции плазмиды pCA25::Tn9 эндонуклеазами *HpaI* и *PstI* (см. рис. 2, трек 2) на треке должны быть видны пять фрагментов. Однако обнаруживаются только три, что объясняется частичными недоварами плазмидной ДНК при данной рестрикции. По той же причине при тройной рестрикции эндонуклеазами *BglII* + *EcoRI* + *PstI* вместо четырех фрагментов имеются три (см. рис. 2, трек 5). Можно предположить, что в данном варианте гидролиза рестриктаза *PstI* один из двух сайтов на плазмидной ДНК расщепляет не полностью.

Рестрикции *EcoRV* + *BglII* и *EcoRV* + *HpaI* плазмиды pCA25::Tn9 (см. рис. 2, треки 7 и 10) отличаются от рестрикции плазмиды pCA25 (см. рис. 2, треки 6 и 8) только изменением размера фрагмента В на размер транспозона Tn9 (см. табл. 1).

Анализ рестрикции плазмиды pCA25::Tn9 эндонуклеазами *EcoRV* + *EcoRI* (см. рис. 2, трек 12) показывает, что фрагмент В, в который встраивается транспозон Tn9, уменьшился на размер появившегося четвертого фрагмента (см. табл. 1), образовавшегося вследствие наличия на транспозоне сайта для рестриктазы *EcoRI*.

Таким образом, в результате физического картирования плазмид pCA25 и pCA25::Tn9 нами предложена рестрикционная карта криптоической плазмиды *E. carotovora* (рис. 3), являющейся представителем наиболее распространенного размерного класса внехромосомных ДНК для данной бактерии. Благодаря наличию транспозонной метки в плазмиде стало возможным уточнение взаимного расположения сайтов рестрикции, а также местоположения транспозона Tn9 в плазмидной ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований НДР Ф25/637-2007.

1. Товкач Ф. И. Выделение и предварительная характеристика криптоических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – **70**, № 6. – С. 804–810.
2. Бурова Л. М., Горб Т. Е., Товкач Ф. И. Природа криптоической плазмиды pCA25 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48A // Микробиол. журн. – 2007. – **69**, № 2. – С. 23–28.
3. Сергеева Ж. Ю., Бурова Л. М., Товкач Ф. И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Там само. – 2006. – **68**, № 4. – С. 34–39.
4. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. – 1981. – **145**, No 3. – P. 1365–1373.

5. Pühler A., Krishnapillai V., Heilmann H. Transposition of Tn1 to the phage P1 genome: isolation of restriction deficient mutants // Advanced Molecular Genetics / Eds. A. Pühler, K.N. Timmis. – Berlin: Springer, 1984. – P. 111–124.
6. Rosner J. L., Gottesman M. M. Transposition and deletion of Tn9: a transposable element carrying the gene for chloramphenicol resistance // DNA insertion elements, plasmids and episomes / Eds. A. I. Bukhari, J. A. Shapiro, S. L. Adhya. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. – P. 213–218.

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

Поступило в редакцию 06.04.2009

Zh. U. Sergeeva, F. I. Tovkach

Restriction site mapping of *Erwinia carotovora*'s extrachromosomal element pCA25

*The restriction site mapping of *Erwinia carotovora*'s extrachromosomal element pCA25 and its transposon variant pCA25::Tn9 has been performed. Plasmid pCA25 belongs to the most widespread size class of *erwinia*'s extrachromosomal DNAs 9.8 kb. The preliminary restriction map of the plasmid has been created, and the site of the Tn9 transposon incorporation has been detected corresponding to the obtained data.*