УДК 579.6+ 578

Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ-АНТАГОНІСТІВ РОДУ *BACILLUS*

Метою *дослідження було вивчення плазмідних профілів та ефективності виділення плазмід грампозитивних бактерій-антагоністів роду Bacillus різними методами.* ***Методи****. В роботі використано штами бактерій видів B. thuringiensis і B. subtilis. Виділення плазмідних ДНК з клітин бактерій здійснювали лужним методом Кадо і Ліу, методом Дженсена та методом Кроса. Плазмідну ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.* ***Результати.*** *В результаті вивчення плазмідного складу штамів B. thuringiensis і B. subtilis було виявлено, що 90% штамів утримують від 5 до 7 позахромосомних елементів різного розміру.* ***Висновок.*** *Виявлені у досліджених штамів бацил плазміди умовно можна поділити на дві групи: невеликі плазміди, розміром приблизно 10 т.п.н., і мегаплазміди, розміром від 100 до 200 т.п.н. Для отримання повноцінної картини плазмідних профілів B. thuringiensis або B. subtilis найбільш ефективним є адаптований метод Дженсена.*

Ключові слова: Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis, плазміди, плазмідні профілі.

Bacillus thuringiensis є широко розповсюдженою бактерією, яку можна виділити з різних екологічних ніш, таких як ґрунт, вода, комахи, зернові продукти тощо. Плазміди *B. thuringiensis* можуть бути наявні у кількості від 1 до 17 на клітину і мати розмір від 3 до 120 т.п.н., та несуть у собі гени, що відповідають за резистентність до антибіотиків, синтез ентомопатогенних токсинів та ін. [4, 6]. Плазмідні профілі – це якісна характеристика, представлена специфічним набором плазмід вони можуть бути використані для характеристики окремих штамів [1, 2, 3].

Тобто, плазмідні профілі можуть бути цінним інструментом для характеристики будь-яких бактерій, у тому числі багатьох бактерій роду *Bacillus*, зокрема *B. thuringiensis* і *B. subtilis*. Бактерії можуть втрачати плазміди, але базовий набір залишається незмінним, і може бути виявленим і вивченим. Крім того, плазмідні профілі дозволяють диференціювати специфічні штами, які належать до інтелектуальної власності [3, 4].

Існують різні методи виділення позахромосомних генетичних елементів бактерій, але підбір адекватного методу для отримання відтворюваних та достовірних результатів досі залишається актуальним. Особливо це стосується

© Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця, 2015

пошуку методичних підходів для вивчення плазмідного складу окремих груп бактерій.

Метою нашого дослідження було виявити та оцінити вміст позахромосомних генетичних елементів штамів бактерій роду *B. thuringiensis* і *B. subtilis* з використанням різних методичних підходів.

Матеріали і методи

В дослідженнях використовували штами *B. thuringiensis* ОНУ 392, ОНУ 513, ОНУ 514, ОНУ 515, ОНУ 516, ОНУ 517, ОНУ 518 (ізольовані з мертвих комах) і *B. subtilis* ОНУ 410, ОНУ 519 (ізольовані з ризосфери рослин), з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Культури бактерій вирощували при оптимальній температурі 25–30 °С протягом 16–18 год у 2 мл рідкого повноцінного поживного середовища LB (пептон 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л).

Виділення плазмідної ДНК проводили лужним методом Кадо і Ліу, методом Кроса для будь-яких бактерій і плазмід і методом Дженсена, адаптованим для виділення плазмід *B. thuringiensis* або *B. subtilis*.

Лужний метод Кадо і Ліу [5]**.** Біомасу бактерій, отриману осадженням клітин 16–18 годинної культури, ресуспендували в 100 мкл буфера Е (40 мМ тріс-HCl, 2мМ ЕДТА pH 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера Кадо (тріс-HCl – 609 мг, додецилсульфат натрію (SDS) – 3 г, H_2O – 100 мл, 2М NaOH – 2,2 мл). Зразки інкубували при 60–68 °С впродовж 30–45 хв. Після цього до лізату додавали подвійний об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 10000 об/хв (8000g), 15–20 хв. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем. Далі додавали 1 об'єм хлороформу, перемішували і знову центрифугували.

Метод Дженсена [3]. Стандартні лужні методи або протоколи з кип'ятінням більш ефективні для виділення малих плазмід, але майже або, навіть, зовсім не підходять для виділення великих плазмід. Наступний протокол є добре відтворюваним і дає повноцінну картину плазмідних профілів *B. thuringiensis, B. subtilis* або *B. cereus*.

Біомасу клітин ресуспендували в 100 мкл буфера Е з сахарозою (15% сахарози, 40 мМ тріс-HCl, 2 мМ ЕДТА pH 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера (3% SDS, 50мМ тріс-HCl pH 12,5). Зразки інкубували при 60 °С впродовж 30 хв. Після цього до лізату додавали 5 U протеїнази К і перемішували 20 разів. Далі інкубували 90 хв при температурі 37 °С. Після цього додавали 1 мл суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували 40 разів до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 11000 об/хв (8800g), 15 хв.

Метод Кроса [5]**.** Біомасу клітин ресуспендували в 2 мкл буфера ТЕ (0,05М тріс-HCl pH 8,0, 0,01М ЕДТА). Центрифугували і знов ресуспендували

в 40 мкл буфера ТЕ. До суспензії додавали 600 мкл буфера ТЕ з 4% SDS (pH 12,5). Зразки інкубували при 37 °С протягом 20–30 хв. Після цього до лізату додавали 30 мкл 2М тріс-HCl pH 7,0, а потім 240 мкл 5 М NaCl, інкубували 4 год на льоду. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 11000 об/хв (8800g), 10 хв. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем і додавали подвійний об'єм (800 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 10000 об/хв (8000g), 15–20 хв. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем. Далі додавали 1 об'єм хлороформу, перемішували, і знов центрифугували.

Препарати плазмідних ДНК зберігали за 4 °С. У всіх методах верхню фазу зі зразками отриманої плазмідної ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (агароза 0,55–0,75%, 55–60В, 4–4,5 год, обладнання фірми "BioRad": камера SubCell GT, джерело напруги PowerPac Basic, візуалізація результатів проведена на трансілюмінаторі Molecular Imager Doc XR$^+$ imaging system за допомогою програми «Quantity One»).

Результати та їх обговорення

У результаті вивчення складу плазмід штамів *B. thuringiensis* і *B. subtilis* за допомогою метода Дженсена, адаптованого для виділення плазмід з клітин бацил, було виявлено, що майже усі штами утримують позахромосомні елементи різного розміру, переважно мегаплазміди (рис. 1, А). Виявлені плазміди умовно можна поділити на дві групи: невеликі плазміди, розміром приблизно 10 т.п.н., і мегаплазміди, розміром від 100 до 200 т.п.н. Встановлено, що штами *B. thuringiensis* утримують від 5 (ОНУ 513, ОНУ 515, ОНУ 516, ОНУ 517) до 7 (ОНУ 392) позахромосомних елементів (рис. 1, А, Б).

Невеликі за розміром позахромосомні елементи зазвичай виділяються у більшій кількості через наявність їх у клітині у більшій кількості копій; однак у випадку з виділенням плазмід з клітин *B. thuringiensis* і *B. subtilis* методом Дженсена значно краще виділяються мегаплазміди (рис. 1, А). Після 7 днів відмивання агарозного гелю у дистильованій воді від залишків зайвого бромистого етідію (рис. 1, Б) краще розрізняються смуги, які відповідають мегаплазмідам.

У подальших дослідженнях плазмід штамів *B. thuringiensis* і *B. subtilis* порівнювали якість виділення плазмід різними методами (адаптований метод Дженсена, лужний метод Кадо і Ліу та метод Кроса) (рис. 2).

Дослідження показали, що для отримання повноцінної картини плазмідних профілів *B. thuringiensis* та *B. subtilis* найбільше підходить адаптований метод Дженсена, який дозволяє виявити на електрофореграмі мегаплазміди бацил разом з плазмідами невеликого розміру (рис. 1) і у значно більшій кількості виділеної ДНК порівняно з іншими методами (рис. 2). Метод Кроса не підходить для виділення плазмід бацил, на гелі після електрофорезу відсутні смуги плазмідної ДНК (рис. 2). Лужний метод Кадо і Ліу дає можливість здійснити скринінг щодо наявності плазмід, але не дає повноцінної картини плазмідних

профілів штамів бацил, особливо у відношенні мегаплазмід і у порівнянні з результатами отриманими методом Дженсена (рис. 2).

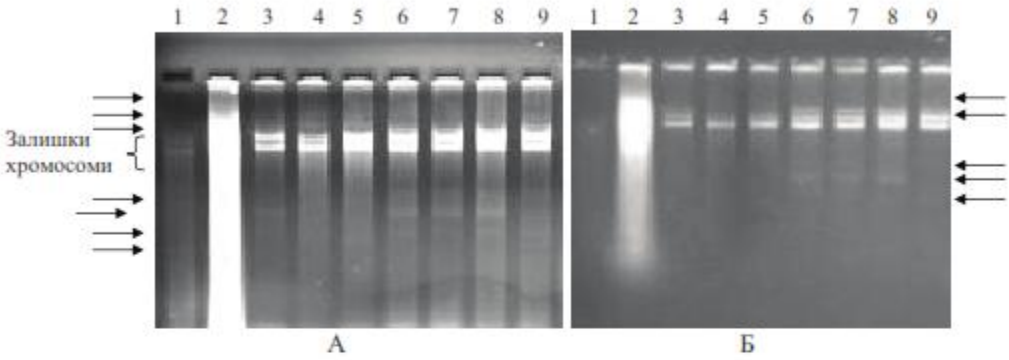


Рис. 1 (А, Б). Плазмідні спектри *B. subtilis* ОНУ 410 (1), ОНУ 519 (2) і *B. thuringiensis* ОНУ 515 (3), ОНУ 514 (4), ОНУ 518 (5), ОНУ 513 (6), ОНУ 516 (7), ОНУ 517 (8), ОНУ 392 (9). Агароза – 0,55 %, 55В, 4 години.

Тут і надалі стрілками вказані позахромосомні ДНК.
Примітка: А – гель після візуалізації ДНК бромідом етидію,
Б – гель після 7 днів відмивання у DH_2O.

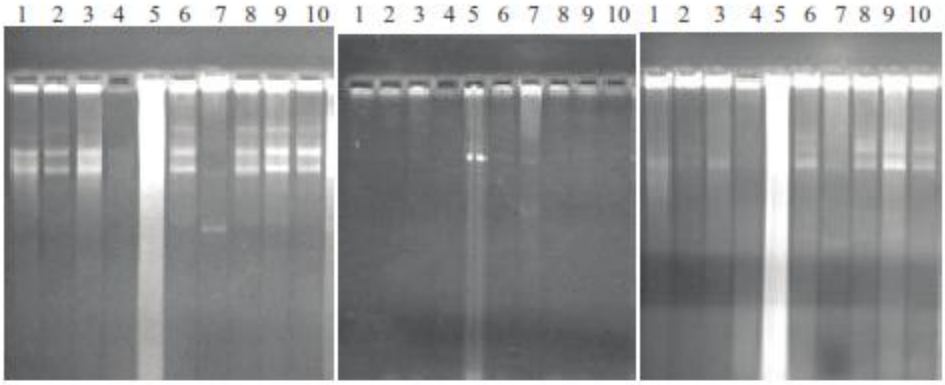
Fig. 1 (А, Б). Plasmid profiles of *B. subtilis* ONU 410 (1), ONU 519 (2) and *B. thuringiensis* ONU 515 (3), ONU 514 (4), ONU 518 (5), ONU 513 (6), ONU 516 (7), ONU 517 (8), ONU 392 (9). Agarose – 0.55 %, 55V, 4 hours.

Here and further nonchromosomal DNAs are indicated by the arrows.
Note: A – gel after ethidium bromide staining,
Б – gel after 7 days wash in DH_2O.

Характеристика плазмідних профілів штамів бацил також показала, що штами *B. thuringiensis* ОНУ 513, ОНУ 515, ОНУ 516, ОНУ 517 і ОНУ 392 можливо є спорідненими через наявність декількох плазмідних смуг на одному рівні на електрофореграмах. З іншого боку штами *B. thuringiensis* ОНУ 514 і ОНУ 518 теж мають декілька плазмідних смуг на одному рівні на електрофореграмах, а тому теж можуть бути спорідненими. Крім того, завдяки різним плазмідним профілям на електрофореграмах виявлено відсутність близької подібності штамів *B. thuringiensis* ОНУ 514 і ОНУ 518 з однієї сторони і ОНУ 515 з другої, не зважаючи на виділення цих штамів з одного зразка тканин комах.

Для бактерій групи *B. thuringiensis* показана наявність множинного утримання плазмід різного розміру [6], і результати наших досліджень також це демонструють. Крім того, відзначається наявність в клітинах одного штаму декількох мегаплазмід близьких за розміром [3], що теж підтверджується отриманими нами даними (рис. 1).

Таким чином, адаптований метод Дженсена дає найбільш повну картину плазмідного профілю штамів *B. thuringiensis* і *B. subtilis*. Встановлено, що 90% штамів утримують від 5 до 7 позахромосомних елементів різного розмі-



Метод Дженсена
Jensen method

Метод Кроса
Cross method

Метод Кадо і Ліу
Kado and Liu method

Рис. 2. Плазмідні спектри *B. thuringiensis* ОНУ 514 (1), ОНУ 515 (2), ОНУ 518 (3), ОНУ 513 (6), ОНУ 516 (8), ОНУ 517 (9), ОНУ 392 (10) і *B. subtilis* ОНУ 410 (4), ОНУ 519 (5); pCA25 9,8 т.п.н. (7).

Агароза — 0,75%, 60В, 4,5 години.

Fig. 2. Plasmid profiles of *B. thuringiensis* ONU 514 (1), ONU 515 (2), ONU 518 (3), ONU 513 (6), ONU 516 (8), ONU 517 (9), ONU 392 (10) and *B. subtilis* ONU 410 (4), ONU 519 (5); pCA25 9,8 kb (7).

Agarose — 0.75%, 60V, 4.5 hours.

ру. Плазмідні ДНК досліджених штамів бацил умовно розподіляються на дві окремі групи: невеликі плазміди, розміром 10 т.п.н. і мегаплазміди, розміром від 100 до 200 т.п.н.

Zh. Sergieieva, V. Ivanytsia

Odesa Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str.,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

PLASMID PROFILES OF *BACILLUS* GENUS ANTAGONISTIC STRAINS

Summary

The **aim** *of the study was to investigate plasmid profiles and to compare the results of the Gram-positive Bacillus genus bacteria plasmid isolation efficiency by various methods.* **Methods**. *Strains of B. thuringiensis and B. subtilis were used. Plasmids isolation from the cells was carried out using alkaline Kado and Liu method, Jensen method and Cross method.* **Results.** *Plasmid profiles study of B. thuringiensis and B. subtilis strains revealed that 90% of strains carried from 5 to 7 extrachromosomal genetic elements of different sizes.* **Conclusion.** *Isolated plasmids can be divided into two groups: small plasmids, about 10 kb in size and megaplasmids 100 to 200 kb. The most suitable method for the study and complete picture of B. thuringiensis or B. subtilis plasmid profiles was Jensen method adapted for bacillus megaplasmids isolation.*

Key words: Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis, plasmids, plasmid profiles.

Ж.Ю. Сергеева, В.А. Иваныця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова ул. Дворянська, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

ПЛАЗМИДНЫЕ ПРОФИЛИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ РОДА *BACILLUS*

Реферат

Целью *исследования было изучение плазмидных профилей и сравнение эффективности выделения плазмид грамположительных бактерий-антагонистов рода Bacillus различными методами.* **Методы**. *В работе использовались штаммы бактерий-антагонистов B. thuringiensis и B. subtilis. Выделение плазмид из клеток осуществлялось щелочным методом Кадо и Лиу, методом Дженсена и методом Кросса. Плазмидную ДНК анализировали при помощи электрофореза в агарозных гелях.* **Результаты.** *В результате изучения плазмидного состава штаммов B. thuringiensis и B. subtilis было обнаружено, что 90% штаммов содержат от 5 до 7 внехромосомных генетических элементов различного размера.* **Вывод.** *Выявленные плазмиды условно можно разделить на две группы: небольшие плазмиды, размером примерно 10 т.п.н., и мегаплазмиды, размером от 100 до 200 т.п.н. Для получения полноценной картины плазмидных профилей B. thuringiensis или B. subtilis наиболее подходит адаптированный метод Дженсена.*

Ключевые слова: Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis, плазмиды, плазмидные профили.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Andrup L.* Detection of large plasmids from the Bacillus cereus group / L. Andrup, K. K. Barfod, G. B. Jensen, L. Smidt // Plasmid. – 2008. – V. 59, № 2. – P. 139–143.

2. *Guglielmetti S.* Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: organization, distribution, and their possible role in host physiology / S. Guglielmetti, D. Mora, C. Parini // Plasmid. –2007. – V. 57, № 3. – P. 245–264.

3. *Jensen G.B.* The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis is located on the large conjugative plasmid pXO16 / G. B.Jensen et al. // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177. – P. 2914–2917.

4. *Leplae R.I.* A first global analysis of plasmid encoded proteins in the ACLAME database / R.I. Leplae, G. Lima-Mendez, A. Toussaint // FEMS Microbiol. Rev. – 2006. – V. 30, № 6. – P. 980–994.

5. *Rohde C.* Plasmid isolation from bacteria: some fast procedures / C. Rohde // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1995. – V. 11, Issue 3. – P. 367–369.

6. *Zhong C.* Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520/ C. Zhong et al. // PLoS ONE. – 2011. – V. 6, № 1. – P. 1–8.

Стаття надійшла до редакції 26.02.2015 р.