

УДК 577.113:579.254.2:579.873.7:633.15

В.В. Лук'янчук, Л.В. Поліщук

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна*

КЛОНУВАННЯ АМПЛІКОНА ПОСЛІДОВНОСТІ SCO1206 ХРОМОСОМИ *STREPTOMYCES COELICOLOR A3(2)*¹

*За допомогою полімеразної ланцюгової реакції ампліковано фрагмент хромосоми *Streptomyces coelicolor A3(2)*, що містить ген SCO1206, який кодує білки субодиниць ферменту полікетид синтази III типу. Проведено клонування амплікованої ДНК в човниковому векторі pWHM4 по сайтам HindIII та EcoRI в *Escherichia coli XL1 Blue* та переклонування в безплазмідному варіанті *Streptomyces globisporus 1912*.*

*Дані рестрикційного аналізу плазмідних ДНК всіх досліджуваних трансформантів як *Escherichia coli*, так і *Streptomyces globisporus 1912* свідчать, що молекулярний розмір проклованого фрагменту ДНК становить 1,1 тпн.*

*Дослідження комплексу метаболітів, синтезованих трансформантами *Streptomyces globisporus 1912* встановило наявність нових речовин, що не синтезувалися реципієнтом.*

*Ключові слова: ПЛР, клонування, плазміда, рестрикція, *Escherichia coli*, стрептоміцет, метаболіт, ТШХ.*

Промисловими продуцентами багатьох полікетидних сполук, які застосовуються в медицині та ветеринарії у ролі антибіотичних, імуносупресорних і антигельмінтних препаратів є представники родини *Streptomyces*. Велике значення мають ці речовини і для самої клітини мікроорганізму. Наприклад, встановлено, що флавоноїди здійснюють захисні та регуляторні функції.

Синтез полікетидного скелету здійснюється полікетидсинтазами. Однак наступні модифікації, які здійснюються рядом ферментів (циклази, оксидази, кеторедуктази, глікозил-трансферази тощо), необхідні для визначення біологічних функцій окремих полікетидних сполук [8, 9]. На даний час виявлено кілька типів полікетидсинтаз. Полікетидсинтази III типу (PKS III) – це гомодимерні ферменти, кожна субодиниця яких складається з 300–350 амінокислотних залишків. PKS III виявлені у багатьох мікроорганізмів. Гени полікетидсинтаз і завершальних ферментів зібрані на хромосомі у великі кластери. У геномі *S. coelicolor A3(2)* виявлено послідовності для трьох типів PKS, одна із яких SCO1206 кодує RppA-подібну THN-синтазу (PKS третього типу) [7, 8, 9].

¹Робота виконана за часткового фінансування за рахунок бюджетних коштів для підтримки об'єкта національного надбання – «Колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України».

Метою роботи є створення стабільної гібридної плазмідної конструкції, яка містить нуклеотидну послідовність ферменту PKS III *S. coelicolor A3(2)* (SCO1206), здатної функціонувати в клітинах як кишкової палички, так і стрептоміцетів.

Матеріали і методи. При виконанні роботи використовувалися культури *S. coelicolor A3(2)* [1, 7], *S. levoris* 165, безплазмідний варіант *S. globisporus* 1912 [5, 6] та *Escherichia coli XL1 Blue (tet^R)* [2]. Як вектори використовували біфункціональні плазмідні рWHM4 (6,6 тпн) та рAX5a (8,1 тпн) [13, 14]. В роботі використовували середовища: соєве, S-середовище (рідкий варіант), МПА та МПБ [1, 12]. Для селекції трансформантів кишкової палички і нарощування їх біомаси в середовище додавали антибіотики ампіцилін (100 мкг/мл) та тетрациклін (15 мкг/мл). При відборі стрептоміцетних трансформантів в середовище додавали гіострептон, відповідно рекомендаціям [9, 14]. Плазмідну ДНК виділяли за методом Кізера [11]. Хромосому *Streptomyces coelicolor A3(2)* отримували, використовуючи рекомендації Маніатіса і співавторів [3]. Гідроліз та лігування фрагментів ДНК проводили згідно з рекомендаціями тієї ж збірки методик [3]. В експериментах з гідролізу та лігуванню ДНК використовували ферменти та буфери фірми МВІ “Fermentas” (Литва) [2].

Компетентні клітини *Escherichia coli XL1 Blue* отримували, трансформували та відбирали за класичними методиками [3]. При клонуванні гібридних плазмід протопласти безплазмідного варіанта *Streptomyces globisporus* 1912 отримували, трансформували та відбирали відповідно методикам запропонованим Хопвудом та Оканіші [12].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal (“Eppendorf”, Німеччина). Застосований режим ПЛР: початкова денатурація – 95°C – 120”; 35 циклів: 96°C – 20”; 50°C – 20”; 60°C – 240”; заключна елонгація: 60°C – 240”. Реакційна суміш містила: 10 mM TrisHCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 одиниця Taq-полімерази, 30 pM праймера, 10 мкл ДНК. Суміш нуклеотидів і Taq-полімерази використовували фірми МВІ “Fermentas” (Литва). Послідовності праймерів наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Послідовності праймерів, що були використані в роботі

Нуклеотидна будова праймерів	Напрямок	Ендонуклеаза
5'-TTTT <u>AAGCT</u> TATGGCGACTTTGTGCAGAC-3'	прямий	HindIII
5'-TTTTGAATTCATGCCTGCCTCACCTCCGC-3'	зворотний	EcoRI

Примітка. Підкреслено нуклеотидні послідовності сайтів рестрикції.

Електрофоретичне розподілення ПЛР продуктів проводили в 1,5 % агарозному гелі. Для визначення молекулярної маси отриманих продуктів ампліфікації використовували маркер молекулярного розміру 100 bp DNA Ladder фірми “Promega” (США).

Здатність продукувати антибіотичні речовини досліджували накладанням 5 денних блоків, що вирощували газonom на агаризованому соєвому середовищі, на свіженанесений газон тестерної культури *S. levoris* 165 [6].

Дослідження складу комплексу синтезованих метаболітів проводили згідно з методикою [4]. Вирощували культури 6 діб на агаризованому соєвому середовищі, екстрагували сумішню хлороформ-ацетон (2:1), після випарювання в вакуумному випарювачі при температурі 45 °C метаболіти розчиняли в ацетоні. Склад комплексу метаболітів досліджували за допомогою ТШХ на пластинках Cromatofolhas AL TLC Silicagel 60F фірми “Merck” в системі розчинників бензол-етилацетат-ацетон-етанол (4:2:1:0,5).

Результати та їх обговорення. На базі інформації про нуклеотидну послідовність PKS III *S. coelicolor A3(2)* було підібрано олігонуклеотидні праймери (табл. 1) для ПЛР [7]. Кожен олігонуклеотид містив по 20 н відповідної послідовності гена PKS III *S. coelicolor A3(2)*, нуклеотидну послідовність сайту пізнавання для відповідної ендонуклеази рестрикції та по чотири кінцеві нуклеотиди. Клонування отриманих ПЛР-копій послідовності SCO1206 в складі човникових векторів рWHM4 і рAX5a було вирішено провести по унікальним сайтам рестрикції для EcoRI та HindIII, що знаходяться в полілінкерних фрагментах векторних молекул і не мають сайтів на послідовності SCO1206. До складу прямого праймера входить

послідовність сайту пізнання для ендонуклеази HindIII, а до складу зворотного праймера – сайт для рестриктази EcoRI (табл. 1).

ПЛР-продукти, одержані за допомогою ПЛР на цільовому фрагменті досліджували електрофоретичним розподіленням в агарозному гелі. Було одержано ПЛР-амплікони молекулярним розміром 1,144 тпн. Довжину було вираховано за даними електрофоретичного розподілу ПЛР-продуктів та на основі інформації про первинну будову відповідного фрагменту хромосоми *S. coelicolor* A3(2) [7].

ПЛР-амплікони і ДНК векторів обробляли ендонуклеазами II типу EcoRI і HindIII та проводили спільне лігування отриманих рестриктів. Лігваною сумішшю трансформували компетентні клітини кишкової палички. Відбирали трансформанти стійкі до ампіциліну та тетрацикліну. Стійкість до тетрацикліну детермінується хромосомою реципієнта. Стійкість до ампіциліну забезпечується генами векторних плазмід.

Виділені з Ar^Rтрансформантів плазмідні ДНК мали молекулярний розмір 7,7 тпн чи 8,4 тпн (відповідно до векторів клонування pWHM4 чи pAX5a). Електрофорез продуктів гідролізу ендонуклеазами EcoRI та HindIII плазмідних ДНК ряду трансформантів підтвердив наявність клонованої послідовності з молекулярним розміром 1,1 тпн (рис. 1).

Гібридними плазмідами, створеними на базі як pWHM4, так і pAX5a трансформували протопласти безплазмідного варіанту *S. globisporus* 1912. Рестрикційний аналіз позахромосомних ДНК тіострептонорезистентних трансформантів продемонстрував, що вони зберегли молекулярні розміри і структуру молекул ДНК, якими трансформували протопласти реципієнта (рис. 2).

Як відомо, першою PKS III, виявленою у стрептоміцетів був білок RppA (від слів redbrown pigment production) [10]. Серед відібраних тіострептонорезистентних трансформантів *S. globisporus* 1912 було виявлено кілька зі зміненням, порівняно з реципієнтною культурою, пігментоутворенням. Повітряний та субстратний міцелії безплазмідного варіанту *S. globisporus* 1912 мають ледь жовтаве забарвлення, в той час як міцелії ряду трансформантів здобули світло коричневе забарвлення. Пігмент не дифундує в середовище.

Дослідження за допомогою методу тонкошарової хроматографії екстрактів з міцелію «темних» трансформантів виявили нові метаболіти, що були відсутні у реципієнта та інших, незабарвлених трансформантів. Ці метаболіти утворювали на силікагелевих пластинках забарвлені в коричневий колір плями, що мають Rf 0,23 та 0,58.

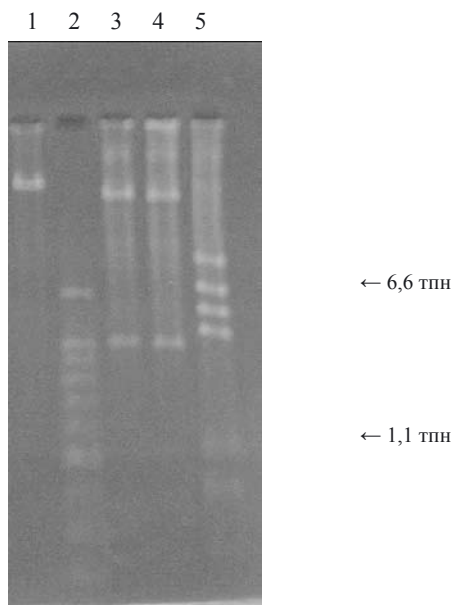


Рис. 1. Електрофоретичне розподілення фрагментів плазмідних ДНК трансформантів *E. coli* (вектор pWHM4) трЕс6 (рЕс6) та трЕс8 (рЕс8):

1 – pWHM4 + EcoRI + HindIII; 2 – 100 bp DNA Ladder,
3 – pEc 6 + EcoRI + HindIII; 4 – pEc 8 + EcoRI + HindIII, 5 – pEc6 + BglI.

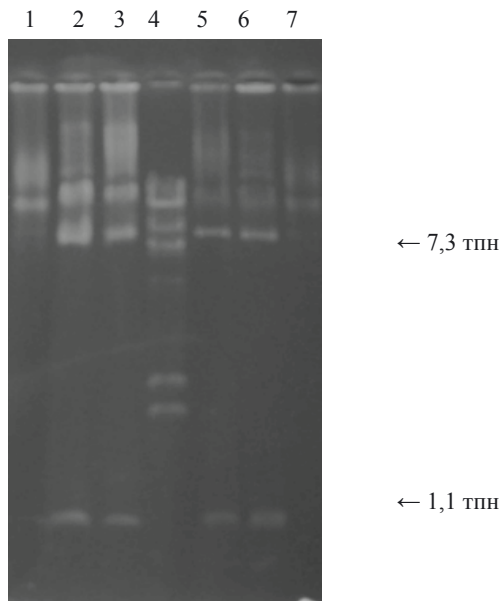


Рис. 2 Електрофоретичне розподілення фрагментів плазмід трансформантів *S. globisporus* TrS11 (pS11) та TrS16 (pS16) (вектор pAX5a):
 1 – pS11; 2, 3 – pS11 + EcoRI + HindIII; 4 – λ + HindIII,
 5, 6 – pS16 + EcoRI + HindIII; 7 – pS16.

Раніше повідомлялося, що штам *S. levoris* 165 є тестерною культурою для виявлення синтезу штамом *S. globisporus* 1912 полікетидного антибіотика ландоміцина Е. Наші дослідження з використанням даної тест-культури не виявили синтезу метаболітів з антибіотичними властивостями у шести тіострептонорезистентних трансформантів, що містили гібридні плазміди, сконструйовані з використанням векторів pWHM4 (4 клони) чи pAX5a (2 клони).

Однак навколо блоків, які були вирізані з газону “темних” трансформантів, було виявлено затримку споруляції – на тлі кремового газону *S. levoris* 165 чітко виділялися білі кола. Найбільші зони були утворені трансформантами, що містили плазміди, сконструйовані на базі pAX5a. Ми вважаємо, що метаболіти, що синтезовані «темними» трансформантами, впливають на диференціацію клітин, пригнічуючи спороутворення.

Надалі планується отриману плазмиду використати в дослідженнях впливу детермінованих клонованим геном продуктів на біосинтетичні властивості продуцентів антибіотиків.

Таким чином, гібридні плазміди, сконструйовані на базі обох векторів, здатні трансформувати та стабільно функціонувати в клітинах як стрептоміцетів, так і *E. coli*. Крім того, у кількох трансформантів виявлено синтез двох нових метаболітів (Rf 0,23 та 0,58), що надають субстратному міцелію світло коричневе забарвлення.

В.В. Лукьянчук, Л.В. Полищук

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

КЛОНИРОВАНИЕ АМПЛИКОНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SCO1206 ХРОМОСОМЫ *STREPTOMYCES COELICOLOR* A3(2)

Резюме

С помощью полимеразной цепной реакции амплифицировано фрагмент хромосомы *Streptomyces coelicolor* A3(2), который содержит ген SCO1206, кодирующий белковые субъединицы фермента поликетидсинтазы III типа. Проведено клонирование амплифицированной ДНК в составе челночных векторов pAX5a и pWHM4 в *Escherichia coli* XL1 Blue. Плазмиды ряда отобранных ампициллинрезистентных клонов трансформированы в протопласты безплазмидного варианта *Streptomyces globisporus* 1912.

Данные рестрикционного анализа плазмидных ДНК всех исследованных трансформантов как *Escherichia coli*, так и *Streptomyces globisporus* 1912 свидетельствуют, что молекулярный размер проклонированного фрагмента ДНК составляет 1,1 тпн.

Исследование комплекса метаболитов, синтезированных трансформантами *Streptomyces globisporus* 1912 выявило наличие новых веществ, которые не синтезируются реципиентом.

Ключевые слова: ПЦР, клонирование, плаزمид, рестрикция, *Escherichia coli*, стрептомицет, метаболит, ТСХ.

V.V.Lukyanchuk, L.V.Polishchuk

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

CLONING OF AN AMPLICONE OF CHROMOSOMAL SCO1206 SEQUENCES OF *STREPTOMYCES COELICOLOR* A 3(2).

S u m m a r y

With the help of polymerase cycle reaction a fragment of chromosome *Streptomyces coelicolor* A 3(2) was amplified which contains gene SCO1206 coding subunit proteins of polyketide synthase III. Cloning of amplified DNA in the structure of shuttle vectors pAX5a and pWHM4 in *Escherichia coli* XL1 Blue was done. Plasmids of some selected ampicillin-resistant clones were transformed into protoplasts of plasmidless variant of *Streptomyces globisporus* 1912.

Restrictional analysis of plasmid DNA of all investigated transformants both *Escherichia coli* and *Streptomyces globisporus* 1912 showed that 1.1 kb fragments of DNA were cloned in them.

Research of the complex of metabolites, synthesized by transformants of *Streptomyces globisporus* 1912 revealed the presence of new substances which were not synthesized by the recipient.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: PCR, cloning, plasmid, restriction, *Escherichia coli*, streptomycete, metabolite, TLC.

The author's address: *Lukyanchuk V.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine.

1. Валагурова В. Е., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. Актиномицеты рода *Streptomyces*. Описание видов и компьютерная программа их идентификации. – Киев: Наукова думка. – 2003. – 645 с.
2. Каталог фірми MBI. “Fermentas”. – 2007–2008.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – Москва: Мир. – 1984. – 450 с.
4. Мацелюх Б.П., Лаврінчук В.Я. Одержання та характеристика мутантів *Streptomyces globisporus* 1912, дефектних по біосинтезу ландоміцину Е // Мікробіол. журн. – 1999. **61**, № 4. – С. 22–27.
5. Полищук Л.В., Стефанишин Е.Е., Дехтяренко Т.Д., Стенько А.С., Заверуха В.Б., Мацелюх Б.П. Трансформація протопластів *Streptomyces sp1912-8* с помощью ДНК плазмиды pSG1912 // Микробиол. Журн. – 1987. – **49**, № 1. – С.24–28.
6. Полищук Л.В., Дехтяренко Т.Д., Стефанишин Е.Е., Мацелюх Б.П., Козырицкая В.Е. Плазмиды стрептомицетов глобиспориновой группы // Микробиол. журн. – 1985. – **47**, № 4. – С.24–28.
7. 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. – **417**. – N 6885. – P. 141–147.
8. Cortes J., Velasco J., Foster G. et al. Identification and cloning of a type III polyketidesynthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea* // Mol. Microbiol. – 2002. – **44**, N 5. – P. 1213–1224.
9. Funa N., Ohnishi Y., Ebizuka Y., Horinouchi S. Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketidesynthase by site-directed mutagenesis // Biochem. J. – 2002. – **367**, N 3. – P. 781–789.
10. Funa N., Ohnishi Y., Fujii I., et al. A new pathway for polyketide syntheses in microorganisms // Nature. – 1999. – **26**, N 6747. – P. 897–899.
11. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid. – 1984. – **12**, N 1. – P. 19–36.
12. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study // J. General Microbiol. – 1989. – **80**, N 1. – P. 389–400.
13. Schumann G., Nurnberger H., Krugel H., Sandmann G. Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus* // Mol. Gen. Genetics. – 1996. – **252**, N 6. – P. 658–666.
14. Vara J., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y.-G. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces cerythreus*) // J. Bacteriology. – 1989. – **171**, N 3. – P. 5872–5881.

Отримана 13.05.2009