

**ПОЛІЩУК Л.В.<sup>1</sup>, ЛУКЯНЧУК В.В.<sup>1</sup>, МАРІЄВСЬКИЙ В.Ф.<sup>2</sup>, РУБАН Н.М.<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

Україна, Д03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 154, e-mail: Polischuk@serv.imv.kiev.ua

<sup>2</sup> Інститут епідеміології та інфекційних хвороб АМН України,

Україна, 03038, Київ, вул. акад. Амосова, 5

## **ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ПЛАЗМІДИ pEC1257**

Одним з сучасних напрямків молекулярної біології і генетики є дослідження первинної будови хромосомних та плазмідних ДНК мікроорганізмів. Найпоширенішим сучасним методом встановлення нуклеотидної послідовності ДНК є сіквенування. Чисельні проекти сіквенування та аналізу ДНК в останні роки 20-го століття та на початку 21-го привели до встановлення послідовностей та опису геномів багатьох мікроорганізмів всіх головних таксономічних груп. Однією з перших була встановлена повна послідовність хромосомної ДНК *Escherichia coli* [1, 2,3].

Як відомо, плазміди мікроорганізмів детермінують ряд властивостей, що здатні забезпечувати виживання клітин-носіїв в несприятливих умовах. Таким чином, визначення нуклеотидної будови плазмідних ДНК корисне, як для дослідження фундаментальних біологічних процесів, так і має практичне значення, наприклад, для генно-інженерних та біотехнологічних робіт [4, 5].

### **Матеріали і методи**

В роботі аналізували гібридну плазмідну ДНК трансформанта *Escherichia coli* (Tr22) [6].

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

Плазмідну ДНК з клітин трансформанта отримували за методикою Т. Kieser [7]. Електрофорез плазмідної ДНК проводили в 0,8 % агарозі в ТБЕ-буфері [8].

Сіквенс-аналіз проводили з використанням пари праймерів:

F-праймер 5'-GTAAAACGACCGCCAGT-3'

R-праймер 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'.

Визначення нуклеотидних послідовностей проводили на сіквенаторі SEQ2000XL "Beckman".

### **Результати та обговорення**

Штам *Escherichia coli* 1257 був виділений від хворого при спалаху внутрішньолікарняної інфекції. У штаму *Escherichia coli* 1257 було виявлено плазмиду pEC1257 (5,0 тпн) [9].

Було проведено клонування плазмиди pEC1257 в човниковому векторі pWHM4 (6,6 тпн). Конструювання гібридних плазмід провели з використанням ендонуклеази BamHI для якої обидві плазмиди мають по одному сайту рестрикції, таким чином гібридна молекула мала молекулярний розмір (11,6 тпн) і містила усю послідовність плазмиди pEC1257. В якості реципієнта для гібридної молекули ДНК використали штам *E. coli* JM109 [6].

Метою даної роботи було встановити нуклеотидну будову 2 фрагментів плазмиди pEC1257, які розташовані по обидва боки від сайту рестрикції для ендонуклеази BamHI. Для сіквенс-аналізу було використано плазмідну ДНК отриманого раніше трансформанта Tr22 [6].

Сіквенування ДНК— це набір біохімічних методів, який дозволяє встановити послідовність досліджуваної ДНК. Сучасні методи сіквенс-аналізу дозволяють швидко визначити первинну будову фрагменту ДНК довжиною 100 – 500 тпн. В теперішній час визначена нуклеотидна послідовність тисяч генів про- і еукаріот і ця інформація накопичена в ряді Інтернет-баз даних. Знаючи нуклеотидну послідовність окремого гена, можна визначити амінокислотну послідовність білка, що він кодує. Раніше для

встановлення первинної будови білка доводилося виконувати дуже дорогі та клопіткі процедури по виділенню та аналізу амінокислотної послідовності білка [1, 2, 3].

Було проведено сіквенування 2 фрагментів ДНК плазмиди рЕС1257, які прилягають до BamHI сайту рестрикції по якому було проведено клонування колійної плазмиди. Розміри визначених нуклеотидних послідовностей становили 534 пн (F-праймер) та 467 пн (R-праймер) (рис).

```
1   AGAGGATCCTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCCTGTA
51  ACGAAAAACGCCTGGGGAGCGTTTAGTCGAGGTTAGTCAGTTGGGGA
101 CTGCTTACCCGAGGTAAGTCTCAGCAGAGCGCANGATACCAAATACT
151 GTTCTTTCAGTGTAGCCGAGTTGGGCCATCACTTCAGAACTCTGTAGCA
201 TCGGATAATTTCGCTCGCTATTCGTACGTGCGCGCAGTGGCTTAGCTTTTA
251 CGGTGGACCAGAGAAGTACCGATAAGCCGCGTCGGCGACGGGGGTCGTG
301 CCACAGCCAGCTGGACGACNANCTAACCCAACTGAGGTACCACGCGTTA
351 CCCATNAAAAGCGCCGCCTTCCGAGGAAAAGGCGGACGGTTCGGTACC
401 GCCAGTTGACAGAACCACAGAAGTTCGGGACCCNTATTTTTATGTGTTNCC
451 CTGCTCCTATTTATAT
```

**Рис.** Визначена нуклеотидна послідовність плазмиди рЕС1257 (R-праймер).

Порівняння визначених нуклеотидних послідовностей плазмиди рЕС1257 з Інтернет-базами даних, які містить інформацію про визначені нуклеотидні послідовності ДНК мікро- і макроорганізмів дозволили виявити тотожність первинної будови фрагменту ДНК з рядом плазмідних та хромосомних ДНК різних видів мікроорганізмів. Наприклад, виявлено наявність тотожних послідовностей (гомологія становить 88-91%) плазмідних ДНК *Escherichia coli* (pColE1-H22, pCol-let, pColK-K235, рМН11, рСА4), *Acetobacter pasteurianus* (pAP2), *Erwinia amylovora* (pEA2.8), *Bacillus intermedius* (pET3ха-barn36), *Enterobacter cloacae* (HSD), *Klebsiella pneumoniae* (pKPN2) та деяких інших. Нуклеотидна будова даного фрагмента плазмиди рЕС1257 виявилася також гомологічною до послідовностей хромосомних ДНК ряду мікроорганізмів, наприклад, *Staphylococcus epidermidis* SR1 та *Vibrio cholerae*.

Значну гомологію нуклеотидної будови (до 91 %) виявлено для фрагменту плазмиди рЕС1257 (R-праймер) в 160 пн з послідовностями відрізка ДНК ряду плазмід *Escherichia coli*: pColE1-H22 (5,1 тпн), pCol-let (5,8 тпн), pColK-K235 (3,8 тпн), рМН11 (6,5 тпн) та інших.

Однак, за отриманими результатами сіквенс-аналізу однозначно визначити функцію даного фрагменту плазмиди рЕС1257 неможливо – гомологічними є нуклеотидні послідовності фрагментів ДНК плазмід та хромосом, для генів які входять до їх складу визначено детермінацію ензимів з різними функціями (стійкість до коліцинів і антибіотиків, рестриктазна активність, ферментація вуглеводів, протеїнів та ряду інших субстратів).

В зв'язку з тим, що послідовності ДНК з даною нуклеотидною будовою досить широко поширені серед мікроорганізмів різних родів та виявлені в складі плазмід - ми вважаємо, що цей фрагмент є консервативним за своєю первинною будовою.

Штам *Escherichia coli* 1257 був виділений від хворого під час спалаху ВЛІ [9]. Для штамів мікроорганізмів, що є збудниками ВЛІ характерна стійкість до антибіотиків, дезинфікуючих засобів та УФ-променів [10]. Встановлено, що стійкість до біоцидів (особливо антибіотиків) у збудників ВЛІ може детерминуватися плазмідними ДНК [11]. Крім того, для багатьох штамів *Escherichia coli* характерною є коліціногенія, яка, як відомо, детермінується плазмідами [4, 5].

Проведено дослідження резистентності госпітального патогену 1257 до 14 антибіотиків різної хімічної природи та механізмів дії. Встановлена резистентність штаму *Escherichia coli* 1257 до ряду антибіотиків, що належать до пеніцилінів,

лінкозамідів та макролідів. В той же час особливо чутливим штам виявився до антибіотиків цефалоспоринової групи цефазоліну та цефтриаксону [6]. Встановлена також здатність цього штаму кишкової палички засвоювати ряд вуглеводів та амінокислот.

Планується продовжити дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей штаму *Escherichia coli* 1257 та визначити які з них мають плазмідну детермінацію.

### **Висновки**

Проведено сіквенс-аналіз нуклеотидної послідовності плазміди pEC1257. Розміри визначених нуклеотидних послідовностей становили 654 пн (F-праймер) та 515 пн (R-праймер). Порівняння визначених нуклеотидних послідовностей плазміди pEC1257 з Інтернет-базою даних, яка містить інформацію про визначені нуклеотидні послідовності ДНК дозволили виявити тотожність первинної будови фрагменту її ДНК з такими ряду плазмідних та хромосомних ДНК різних видів мікроорганізмів (ервіній, бацил, клебсієл, стафілококів, вібріонів та інш).

### **Література**

1. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. (Ред. С. Херрингтон, Дж. Макги) // Москва: Мир.- 1999.- 345 с.
2. Методы молекулярной генетики и генной инженерии. (Ред. Салганик Р.И.) // Новосибирск: Наука.- 1990.-256 с.
3. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот (Ред. Прокофьев М.А.) // Москва: Издательство МГУ.-1985.- 279 с.
4. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии: Минск.-Высшая школа.- 1986.- 186 стр.
5. Брода П. Плазмиды//1982.- Москва: Мир.-220 с.
6. Марієвський В.Ф., Лук'ячук В.В., Поліщук Л.В., Рубан Н.М. Дослідження колийної плазміди pEC1257 //Лабораторна діагностика.-2008 (у друці).
7. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid.- 1984.-vol.12.- № 1.-P.19-36.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии // Москва: Мир.- 1984.-450 с.
9. Марієвський В.Ф., Рубан Н.М., Крелевецька Н.М., Лук'ячук В.В., Поліщук Л.В. Плазмідна штама pEC1257//Лабораторна діагностика.-2006.-38.-№4.-стр. 35-37.
10. Зарицький А.М. Дезінфектологія .Ч.1.- Житомир: Рута.- 2001.- 383 с.
11. Russell A.D., Day M.J. Antibiotic and biocide resistance in bacteria\ Microbios.- 1996.-vol.85.-№342.-p.45-65.

### **Резюме**

Проведено сіквенс-аналіз колийної плазміди pEC1257 (5,0 тпн). Порівняння встановлених нуклеотидних послідовностей фрагментів плазміди pEC1257 з відповідними Інтернет-базами даних дозволили виявити тотожність (88-91%) первинної будови фрагменту її ДНК з рядом плазмідних та хромосомних ДНК мікроорганізмів, представників різних родів та видів

Проведено сиквенс-анализ колийной плазмиды pEC1257 (5,0 тпн). Сравнение определенных нуклеотидных последовательностей фрагментов плазмиды pEC1257 с соответствующими Интернет базами данных позволили выявить гомологию (88-91%) первичного строения фрагмента ее ДНК с рядом плазмидных и хромосомных ДНК микроорганизмов, представителей различных родов и видов.

Sequence analyze of *Escherichia coli* plasmid pEC1257 (5.0 bp) was carried out. Comparison of determined nucleotide sequences of plasmid pEC1257 with corresponding Internet databases have allowed real homology (88-91%) of primary structure of its fragment

DNA to a number of plasmid and chromosomal DNA of microorganisms, representatives of various species and genera.

**ТИЩЕНКО Е.Н., МИХАЛЬСКАЯ С.И., СЕРГЕЕВА Л.Е.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,  
Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com*

### **НЕСТАБИЛЬНОСТЬ RAPD-АМПЛИКОНОВ СОИ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКСИАНИОНАМ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ**

Генетические аспекты устойчивости/толерантности культурных растений к разнообразным абиотическим факторам имеют важное фундаментальное и прикладное значение. Основными неблагоприятными факторами окружающей среды, оказывающими негативное влияние на процессы развития сельскохозяйственных культур и их продуктивность, являются засуха и засоление. Вместе с тем увеличивающееся в последнее время антропогенное загрязнение окружающей среды токсичными элементами ставит и эту проблему в число приоритетных. Актуальным является получение растительных форм с комплексной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Один из вопросов комплексной устойчивости связан с генетическим разнообразием в популяциях растений, которое является результатом изменчивости полинуклеотидных последовательностей ДНК и/или пloidности генома. Источником такого разнообразия может быть соматическая изменчивость при культивировании растений *in vitro* [1]. Однако, поиск новых форм с повышенной устойчивостью к комплексу абиотических факторов затруднен при использовании и традиционных, и биотехнологических методов селекции. В связи с чем нами [2] для гарантированного отбора ценных мутаций, возникающих при культивировании *in vitro* тканей растений, предложено направление клеточной селекции, которое заключается в создании моделированных систем *in vitro* с использованием токсичных концентраций ионов тяжелых металлов, которые даже в микроколичествах оказывают многовекторные стрессовые воздействия на растительный организм. Такой подход экспериментально обоснован на примере табака, а именно, получены клеточные линии и растения-регенеранты, обладающие уникальным свойством – комплексной толерантностью к разным типам засоления (хлоридному и хлоридно-сульфатному), водному стрессу и селективному агенту. В качестве последнего представляют интерес оксианионы вольфрама и ванадия, которые оказывают негативное воздействие на процессы дыхания и фосфорилирования в растениях [3]. К тому же, оксианион вольфрама является токсичным аналогом иона молибдена, входящего в состав кофактора нитратредуктазы – ключевого фермента ассимиляции нитрата, чувствительного к различным абиотическим стрессам [4].

Нами получены клеточные линии сои (*Glycine max* L., Merr), устойчивые к токсичным концентрациям вольфрамат-оксианионов. Такие линии показывают устойчивость к ионным и осмотическим стрессорам. Целью данной работы был анализ изменчивости ДНК вольфрамустойчивой клеточной линии (WR-линия) при действии летальных доз ванадатоксианионов.

#### **Материалы и методы**

ДНК исходного каллуса, индуцированного из листьев стерильных растений сои (*Glycine max* L., Merr.) сорта Киевская 27 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины), и полученной от него WR-линии, культивируемой в