

ЛУКЬЯНЧУК В. В., ГОЛЕМБИОВСКАЯ С. Л., ПОЛИЩУК Л. В.✉

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,  
Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net  
✉ LVPolishchuk@ukr.net

## СТАБИЛЬНОСТЬ НАСЛЕДОВАНИЯ ГИБРИДНОЙ ПЛАЗМИДЫ TrS16 ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТИВАЦИИ ТРАНСФОРМАНТА БЕЗ ПОДДЕРЖИВАЮЩЕЙ СЕЛЕКЦИИ

**Цель.** Изучить стабильность наследования рекомбинантной плазмиды TrS16 (8,4 т. п. н.) клетками стрептомицетного трансформанта TrS16-2 после длительного его хранения без целенаправленной селекции (тиострептон). **Методы.** Применялись микробиологические, генетические и физико-химические методы. Рекомбинантная плазида TrS16 сконструирована на базе гибридной плазмиды рAX5a. Бесплазмидный вариант штамма *Streptomyces globisporus* 1912 использовался в качестве реципиента плазмиды TrS16. **Результаты.** Установлено, что 5 % клеток популяции трансформанта TrS16-2 сохранили устойчивость к тиострептону после его периодических пересевов без селективного давления хранения в течение 5 лет. Гибридная плазида TrS16 выявлена только у четверти из исследованных тиострептон-резистентных колоний трансформанта TrS16-2. **Выводы.** Гибридная плазида TrS16 характеризуется удовлетворительной стабильностью наследования при длительном хранении трансформанта без использования тиострептона для целенаправленной селекции.

**Ключевые слова:** плазида, вектор, вставка, стабильность наследования.

Биотехнология – это новое направление в деятельности человечества, позволяющее целенаправленно изменять генотипы различных организмов (как бактерий, так и животных). Успех работы, имеющей целью улучшения свойств организма, гарантируется стабильным наследованием всех признаков трансгенной культуры как приобретенных в результате генно-инженерных манипуляций, так и исходно свойственных организму реципиента. Однако установлено, что в процессе исследований и практического использования имеют место изменения и фенотипических, и генотипических характеристик трансгенных организмов (например, растений, дрожжей или стрептомицетов). Одной из причин таких нежелательных изменений явля-

ется элиминация гибридной плазмиды или нестабильность ее конструкции [1].

Таким образом, изучение стабильности наследования как клонированных гибридных молекул, так и приобретенных трансформантами свойств – важное и необходимое направление исследований. Во многих лабораториях мира проводят разнообразные эксперименты по изучению причин нестабильности организации гибридных плазмид, элиминации их из клеток трансформанта. Результаты таких исследований являются базой создания векторов, обеспечивающих стабильную вертикальную передачу химерных плазмид и сохранность их организации. Например, в конструкцию векторов включаются гены, повышающие устойчивость их структур: увеличивающих копияемость гибридных плазмид или обеспечивающих их интеграцию в хромосому реципиента.

Информация о стабильности гибридных плазмид и использованных векторов важна как для ученых, занимающихся теоретическими изысканиями, так и для практиков, использующих гибридные плазмиды в производстве.

Общепринятой практикой хранения микроорганизмов, содержащих гибридные плазмиды и векторы (как для ученых, так и для практиков), является тщательная селекция клонов, содержащих исходные конструкции плазмид и векторов. Исследования стабильности наследования гибридных плазмид и использованных векторов после многолетних пересевов без поддерживающей селекции практически не проводятся. Основные усилия исследователей направлены на обеспечение стабильности структур.

**Цель работы** – определить наличие гибридной плазмиды TrS16 (Tsr<sup>R</sup>) в клетках стрептомицетного трансформанта (TrS16-2) после его многолетнего хранения без целенаправленной селекции (тиострептон) и установить молекулярный размер и конструкцию молекул выявленной внехромосомной ДНК.

### Материалы и методы

В работе исследовался стрептомицетный  $Tsr^R$  трансформант TrS16-2, содержащий плазмиду TrS16-2 (8,4 т. п. н.) [2, 3].

Объект исследования представлял для нас интерес, как каротин синтезирующий мутант, полученный в результате генно-инженерных манипуляций. В течение 5 лет проводили периодические пересевы штамма TrS16-2 без добавления тиострептона в среду. Селекцию ликопин синтезирующих вариантов трансформанта TrS16-2 проводили визуальным отбором по интенсивности окраски колоний.

При выполнении представленных исследований использовали такие среды: агаризованные (соевая, соево-кукурузная и среда Гаузе 1) и жидкую среду Оканиши [2–4].

Для определения частоты  $Tsr^R$  колоний в популяции трансформанта по 0,1 мл ряда разведений взвеси его мицелия высевали на чашки Петри со средой Гаузе 1. Выросшие колонии пересевали на среду Гаузе 1 с тиострептоном (50 мкг/мл).

Плазмидную ДНК выделяли методом Кизера [5]. Гидролиз ДНК проводили согласно рекомендациям сборника методик Т. Маниатиса и соавторов [6], используя ферменты и буферы фирмы МВІ «Fermentas» (Литва). Для определения молекулярных размеров полученных рестриктов гибридных плазмид использовали HindIII-фрагменты ДНК фага лямбда как маркер молекулярного размера.

Пробы внехромосомной ДНК и их рестрикты фракционировали с помощью электрофореза в 0,8 % агарозном геле в ТВЕ-буфере [2, 3].

### Результаты и обсуждение

Ранее нами сообщалось о результатах экспериментов по клонированию в протопластах *S. globisporus* 1912 б/п (бесплазмидного варианта исходной культуры) гибридных плазмид, созданных на базе HindIII/EcoRI фрагмента плазмиды рАХ5а и содержащих фрагмент хромосомы (1144 п.н.) *S. coelicolor* А3(2) [2, 3, 7] (рис. 1). Необходимо отметить, что продукт клонированного гена SCO1206 (поликетидсинтаза III) не принимают участия ни в синтезе антибиотика ландомицина Е, ни в синтезе каротиноидов, ни в регуляции экспрессии соответствующих кластеров.

Все первоначально отобранные  $Tsr^R$  трансформанты по фенотипическим признакам

были подобны штамму реципиента – безпигментные и спорулирующие [2] (рис. 2 А). Однако при хранении в селективных условиях наблюдали сегрегацию фенотипических признаков трансформантов. Один из них («Лысый» трансформант TrS16-2) синтезировал каротиноид ликопин, что придавало лиловую окраску его колониям [3] (рис. 2 Б). В течение 5 лет проводилась селекция ликопин синтезирующего варианта трансформанта TrS16-2 визуальным отбором наиболее интенсивно окрашенных лиловых колоний.

После посева взвеси (0,5 мл) мицелия мутанта TrS16-2 на чашки Петри со средой Гаузе 1 было суммарно отобрано 305 колоний. Из них 15 были стойкими к антибиотику тиострептому. Таким образом, количество  $Tsr^R$  колоний в популяции трансформанта составляло приблизительно 5 %.

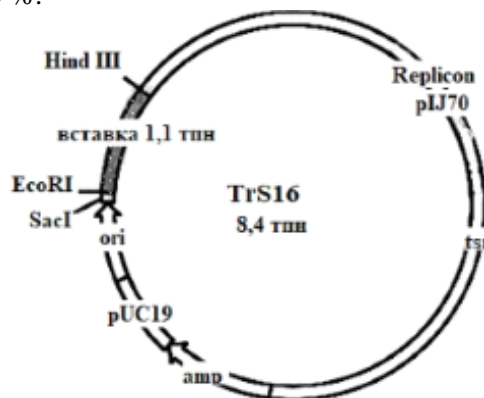


Рис. 1. Генетическая карта гибридной плазмиды TrS16-2.

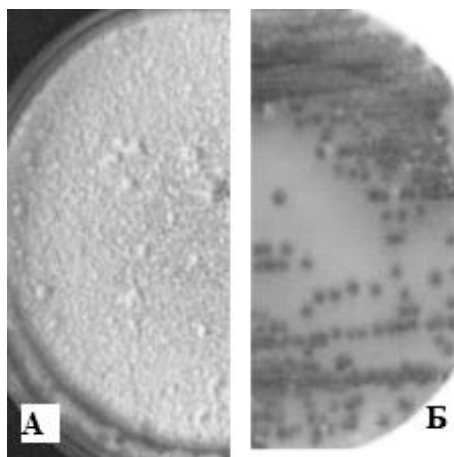


Рис. 2. Фенотипы стрептомицетов: А – бесплазмидный вариант штамма *Streptomyces globisporus* 1912; Б – «Лысый» ликопин синтезирующий трансформант TrS16-2.

12 Tsr<sup>R</sup> колоний были выбраны произвольно для определения молекулярного размера автономных плазмид. Установлено, что только плазмиды 3 клонов сохранили размер клонированной гибридной плазмиды TrS16 – 8,4 т. п. н. Проведенный рестрикционный анализ этих плазмид эндонуклеазами HindIII та EcoRI выявил, что при гидролизе образуются 2 фрагмента: в том числе и фрагмент в 1,1 т. п. н. (рис. 3).

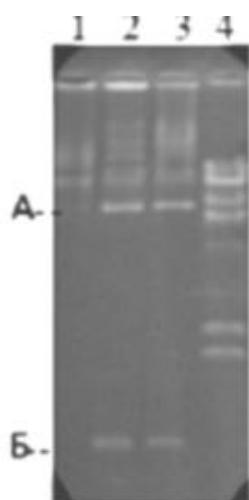


Рис. 3. Электрофоретическое распределение рестрикторов плазмид трансформантов: 1. TrS16а, 2. TrS16а + HindIII + EcoRI, 3. TrS16д + HindIII + EcoRI, 4. λ + HindIII. А – HindIII – EcoRI фрагмент рАХ5а, Б – вставка 1,1 т. п. н.

Таким образом, гибридная плазмиды TrS16 наследуется менее 1 % клеток (3 клон) из 305 проверенных колоний из популяции трансформанта TrS16-2 после 5 лет его периодических пересевов без селективного давления.

Установлено, что внехромосомная ДНК (как пример, плазмиды) имеют изменчивую структуру и существует в стабильной форме только в том случае, если этому способствуют условия среды. Культивирование трансформанта без селективного давления приводит к накоплению в популяции безплазмидных клеток в результате элиминация рекомбинантной плазмиды и клеток, содержащих варианты исходной гибридной конструкции (например, использованный вектор).

Представляло интерес изучить стабильность наследования гибридной плазмиды TrS16 после длительного хранения без селекционного давления. Как сообщалось выше, в популяции данного трансформанта после 5 лет хранения методом периодических пересевов без селекции

сохранилось до 5 % клеток, устойчивых к тиострепту.

Существует 2 типа нестабильности плазмид *in vivo*: сегрегационная – утрата в процессе деления клеток, и структурная – изменение структуры. Также установлена важная проблема шаттл векторов – нестабильность наследования в клетках стрептомицетов [1, 7–9]. Однако устойчивость к тиострепту клеток трансформантов может обеспечиваться присутствием в них как гибридных плазмид, так и вектора.

Проведен анализ молекулярного размера автономных плазмидных ДНК 12 Tsr<sup>R</sup> колоний, выбранных произвольно. Было установлено, что плазмиды 9 изученных клонов имели молекулярный размер, соответствующий размеру HindIII/EcoRI фрагмента плазмиды рАХ5а [7]. Плазмиды же 3 клонов сохранили размер (8,4 т. п. н.) и первоначальную организацию гибридной плазмиды TrS16-2.

Таким образом, четверть спонтанно выбранных клонов содержали плазмиды по организации аналогичных исходной плазмиде TrS16-2.

Даная рекомбинантная плазмиды создана с использованием плазмиды рАХ5а, которая содержит в своей конструкции фрагмент (essential origin) стрептомицетной плазмиды рIJ101, кодирующий информацию, необходимую для репликации и наследования плазмиды [2, 3, 7, 9]. Установлено, что векторы, содержащих аналогичный фрагмент плазмиды рIJ101, характеризуются стабильностью наследования (рIJ702, рIJ486, рIJ211, рIJ303 и множество других). Как пример, после 1 цикла деления без селективного давления рекомбинантная плазмиды рIJ211 сохраняется только в 6 % трансформированных клеток *S. acrimycini* IPV 1610, а гибридная плазмиды рIJ303 – только в 27 % клеток трансформанта *S. albus* G. [9].

Таким образом, гибридная плазмиды TrS16 наследуется 1,2 % клеток популяции трансформанта при хранении и селекции в течение 5 лет методом периодических пересевов без селективного давления.

### Выводы

Гибридная плазмиды TrS16 характеризуется удовлетворительной стабильностью наследования при длительном хранении (5 лет) трансформанта без использования тиострептона для целенаправленной селекции.

## Referenses

1. Ganusov V.V., Bril'kov A.V., Pechurkin N.S. Population dynamics of bacterial plasmids. *Mat. Modeling*. 2001. 13, № 1. С. 77–98. [in Russian] / Ганусов, В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. Популяционная динамика бактериальных плазмид. *Математическое моделирование*. 2001. Т. 13, № 1. С. 77–98.
2. Polishchuk L.V., HOLEMBIOVSKA S.L., Matselyukh B.P., LUKYANCHUK V.V. Genetic variability of synthesis feature of carotenoids in *Streptomyces globisporus* 1912. *Mikrobiol. Z.* 2013. Vol. 75, № 5. P. 40–46. [in Ukrainian] / Поліщук Л.В., Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П., Лук'янчук В.В. Спадкова мінливість ознаки синтезу каротиноїдів у *Streptomyces globisporus* 1912. *Мікроб. журн.* 2013, Т. 75, № 5. С. 40–47.
3. LUKYANCHUK V.V., Polishchuk L.V. Cloning of amplicon of chromosomal SCO1206 sequences of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mikrobiol. Z.* 2010. Vol. 73, № 3. P. 47–51. [in Ukrainian] / Лук'янчук В.В., Поліщук Л.В. Клонування амплікона послідовності SCO1206 хромосоми *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Мікробіол. журн.* 2010, Т. 72, № 3. С. 40–47.
4. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study. *J. General microbial.* 1989. Vol. 80, № 1. P. 398–400.
5. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984. Vol. 12, 1. P. 9–36. doi: 10.1099/00221287-80-2-389.
6. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Moscow: Mir. 1984. 450 p. [in Russian] / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. 450 с.
7. Fass S.H., Engels J.W. Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the alpha-amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*. *J Biol Chem.* 1996. Vol. 271, № 25. P. 15244–15252. doi: 10.1074/jbc.271.25.15244.
8. Schottel J.L., Bibb M.J., Cohen S.N. Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of antibiotic resistance genes derived from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1981. Vol. 146, № 1. P. 360–368.
9. Kieser T., Hopwood D.A., Wright H.M., Thompson C.J. pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.* 1982. Vol. 185, № 2. P. 223–228. doi: 10.1007/bf00330791.

## LUKYANCHUK V. V., GOLEMBIOVSKA S. L., POLISHCHUK L. V.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine,  
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

## INHERITANCE STABILITY OF HYBRID PLASMID TRS16 IN TRANSFORMANT UNDER LONG-TERM CULTURE CONDITIONS WITHOUT SUPPORTING SELECTION

**Aim.** The aim is to define the stability of inheritance the streptomycete recombinant plasmid TrS16 (8.4 kb) by TpS16 – 2 transformant cells of after the long-term storage without a purposeful selection (thiostrepton). **Methods.** Applied microbiological, genetic and physical-chemical methods. The recombinant plasmid of TrS16 was constructed on a base of the hybrid plasmid pAX5a. The plasmidless variant of strain of *Streptomyces globisporus* 1912 was used as a recipient for the plasmid TrS16. **Results.** It is set that 5 % cells of transformant TpS16 – 2 population saved thiostrepton resistance after his periodic subculturings without selective pressure him during 5 years. The hybrid plasmid TrS16 was found only in a fourth from the investigated thiostreptonrecipient colonies of transformant of TpS16 – 2. **Conclusions.** The hybrid plasmid TrS16 is characterized satisfactory stability of inheritance by the transformant TpS16 – 2 after long-term storage of transformant without the use of thiostrepton for a purposeful selection.

**Keywords:** plasmid, vector, insertion, stability of inheritance.

## ЛУК'ЯНЧУК В. В., ГОЛЕМБІОВСЬКА С. Л., ПОЛІЩУК Л. В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,  
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

## СТАБІЛЬНІСТЬ УСПАДКУВАННЯ ГІБРИДНОЇ ПЛАЗМИДИ TrS16 ЗА ТРИВАЛОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ТРАНСФОРМАНТА БЕЗ ПІДТРИМУЮЧОЇ СЕЛЕКЦІЇ

**Мета.** Вивчити стабільність успадкування в клітинах стрептоміцетного трансформанта TpS16-2 рекомбінантною плазмиди TrS16 (8,4 т. п. н.) після його тривалого зберігання без цілеспрямованої селекції (тіострептон). **Методи.** Застосовували мікробіологічні, генетичні та фізико-хімічні методи. Рекомбінантна плазміда TrS16 сконструйована на базі гібридної плазмиди pAX5a. Безплазмідний варіант штаму *Streptomyces globisporus* 1912 використовувався як реципієнт плазмиди TrS16. **Результати.** Встановлено, що 5 % клітин популяції трансформанта TpS16-2 зберегли стійкість до тиострептону після його періодичних пересівань без селективного тиску впродовж 5 років. Гібридна плазміда TrS16 виявлена тільки у чверті з досліджених тиострептон резистентних колоній трансформанта TpS16-2. **Висновки.** Гібридна плазміда TrS16 характеризується задовільною стабільністю успадкування за тривалого зберігання трансформанта TpS16-2 без використання тиострептону для цілеспрямованої селекції.

**Ключові слова:** плазміда, вектор, вставка, стабільність успадкування.