

УДК 579.842.1/.2:579.252

Ж. Ю. Сергеева<sup>1</sup>, Ф. И. Товкач<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина, тел.: 8 (044) 526 61 57, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДНК МЕГАПЛАЗМИД И БАКТЕРИОФАГОВ *ERWINIA CAROTOVORA*

На основании проведённого сравнительного рестрикционного анализа ДНК мегаплазмид размерного класса 64,5–129 т.п.н., полученных из различных штаммов фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*, установлено, что все исследованные плазмиды имеют разные рестрикционные узоры. Сравнительный анализ картин рестрикции мегаплазмиды рСА16-1 и бактериофага NF16 *E. carotovora* штамма ЗЗА выявил несовпадение плазмидной и фаговой ДНК по сайтам рестрикции.

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* *Erwinia carotovora*, мегаплазмиды, бактериофаги, рестрикционный анализ.

Внехромосомные генетические элементы, такие как плазмиды и бактериофаги, достаточно широко распространены у фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* [3]. Для некоторых штаммов эрвиний характерно одновременное наличие мегаплазмид и индуцируемых профагов. В своём большинстве плазмиды *E. carotovora*, в том числе и мегаплазмиды, являются криптическими [6]. Так как *E. carotovora* представляет собой полилизогенную систему, не исключена возможность, того что мегаплазмиды этой бактерии являются молчащими профаговыми репликаонами.

Целью работы было определение совпадений в расположениях сайтов рестрикции на плазмидных и фаговых ДНК на основании проведенного сравнительного рестрикционного анализа мегаплазмид и геномов бактериофагов *E. carotovora*.

### Материалы и методы

В работе были использованы штаммы *E. carotovora* subsp. *carotovora* ЗЗА, NSPPB 549<sup>T</sup>, NSPPB 312<sup>T</sup>, С366 и бактериофаги NF16 и ZF40/421.

Выделение плазмид из клеток *E. carotovora* проводили щелочным методом [5]. Выделение фаговой ДНК осуществляли детергент-фенольным 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*, *EcoRI*, *SalI*, *PstI*, *HindIII* и *BamHI*. Состав рестрикционной смеси был следующий: 5 мкл плазмидного образца, 2 мкл соответствующего 10-кратного буфера для рестрикции, 1 мкл эндонуклеазы и 12 мкл  $H_2O$ . Время рестрикции составляло 2–3 ч при температуре 37 °С. Фрагменты разделяли в 0,9–1,0% агарозных гелях. В качестве маркера размера использовали фрагменты ДНК фага  $\lambda$ , полученные с помощью эндонуклеазы *HindIII*.

Частицы бактериофага NF16 очищали, разделяли и концентрировали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (DEAE 23 SS, Serva 09047). Через колонку диаметром 1,6 см и высотой 32,5 см, уравновешенную 0,02 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,0, пропускали 1000 мл лизата клеток. Затем колонку поэтапно элюировали растворами 0,25 М и 0,4 М NaCl. В составе каждой фракции определяли наличие опалесценции, характерной для растворов вирусных частиц. В результате было получено две пиковые фракции фага NF16: NF16/0,25 М NaCl и NF16/0,4 М NaCl.

### Результаты и их обсуждение

В результате рестрикционного анализа мегаплазмид четырёх штаммов *E. carotovora* рестриктазами *SalI*, *HpaI* и *EcoRI* было выявлено, что ДНК каждой мегаплазмиды имеет уникальную первичную последовательность (рис. 1).

Данные штаммы эрвиний содержат по две различные плазмиды. В клетках штамма 33А мегаплазмиды рСА16-1 (129 т.п.н.) соседствует с плазмидой небольшого размера рСА16-2 (5,3 т.п.н.).

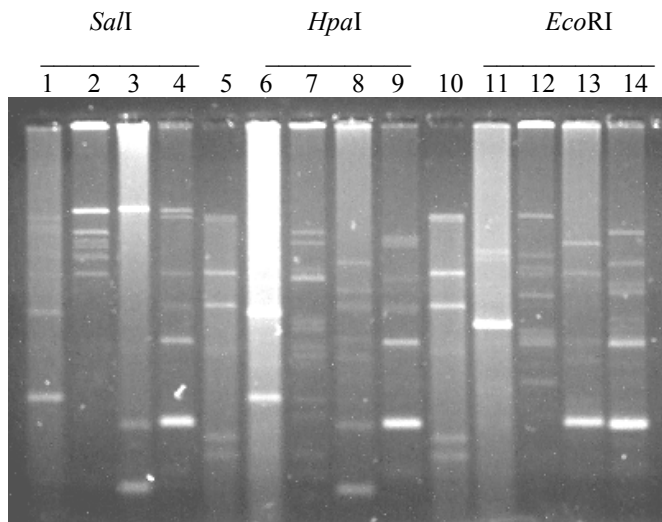


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов рестрикции мегаплазмид *E. carotovora*:  
1, 6, 11 – рСА16-1 (Есс 33А); 2, 7, 12 – рСА 549-1 (NCPPB 549<sup>T</sup>); 3, 8, 13 –  
рСА 312-1 (NCPPB 312<sup>T</sup>); 4, 9, 14 – рСА 42-1 (Есс С366);  
контроль 5, 10 –  $\lambda$  / *HindIII*

Fig. 1. The electrophoregram of the restriction fragments of *E. carotovora* megaplasms:  
1, 6, 11 – рСА16-1 (Есс 33А); 2, 7, 12 – рСА 549-1 (NCPPB 549<sup>T</sup>);  
3, 8, 13 – рСА 312-1 (NCPPB 312<sup>T</sup>); 4, 9, 14 – рСА 42-1 (Есс С366);  
control 5, 10 –  $\lambda$  / *HindIII*

Клетки штамма С366, помимо мегаплазмиды рСА42-1 (129 т.п.н.), содержат также плазмиду рСА42-2, размером 4,3 т.п.н. [3]. Мегаплазмиду рСА549-1 (129 т.п.н.) в штамме NCPPB 549<sup>T</sup> сопровождает плазида малочисленного среди эрвиний размерного класса (47,7 т.п.н.) — рСА549-2 [2]. Клетки штамма NCPPB 312<sup>T</sup> содержат две плазмиды: рСА312-1 (64,5 т.п.н.) и рСА312-2 (3,8 т.п.н.) [3].

В связи с наличием в штаммах нескольких плазмид, мы сравнивали только самые верхние фрагменты на электрофореграмме в диапазоне размеров от 25 до 9 т.п.н. (рис. 1), представляющие собой фрагменты рестрикции мегаплазмид.

Установлено, что на ДНК плазмид рСА16-1, рСА42-1 и рСА549-1 имеются сайты рестрикции для каждой из трёх использованных нами эндонуклеаз рестрикции (*SalI*, *HpaI* и *EcoRI*). Рестриктаза *SalI*, однако, не гидролизовала ДНК плазмиды рСА 312-1 (рис. 1, трек 3) из-за отсутствия соответствующих сайтов узнавания и разрезания на плазмиде. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рестрикционные картины мегаплазмид уникальны, и плазмидные ДНК не имеют одинаковых по размеру рестрикционных фрагментов.

Предполагаем, что различное происхождение данных штаммов *E. carotovora* и несовпадение первичных последовательностей их мегаплазмид может быть связано с тем, что большие внехромосомные ДНК играют важную роль в формировании патогенности эрвиний по отношению к некоторым растениям в соответствующих экологических нишах.

Способность клеток эрвиний провоцировать появление опухолей и возможную причастность к данному явлению мегаплазмиды рСА16-1 проверялись на растениях каланхое Дегремона (*Kalanchoe daigremontiana*). Так как клетки *E. carotovora* вызывают после инфекции растений развитие сильной реакции гиперчувствительности и генерализованную инфекцию всего растения, необходимо было получить диссоцианты исследуемого штамма. С помощью каротоворицина из штамма 48А получены штаммы-диссоцианты 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/1, 3/2 *E. carotovora* 33А.

Ткани листьев каланхое инфицировали суточными суспензиями исходного штамма и его диссоциантов. Штаммы-диссоцианты вызывали более выраженную реакцию гиперчувствительности у растений по сравнению с исходным штаммом. Отличий между отдельными диссоциантами в реакции гиперчувствительности, проявленной растениями, обнаружить не удалось. Было установлено, что клетки эрвиний не осуществляют трансформацию растительных клеток и не провоцируют рост опухолей на растениях каланхое Дегремона, в то же время в контрольных опытах с *Agrobacterium tumefaciens* С58 был получен позитивный результат. Таким образом, мегаплазмиды рСА16-1, очевидно, не является туморогенной.

Клетки *E. carotovora* штамма 33А являются псевдолизогенными и несут бактериофаг NF16 и, после индукции бактериоцинами, начинают продуцировать фаговые частицы. Возможная причастность мегаплазмиды рСА16-1 к профаговому геному NF16 была проверена с помощью сравнительного рестрикционного анализа их геномов эндонуклеазами *HpaI* и *BamHI* (рис. 2).

В результате анализа полученных картин рестрикции (рис. 1, треки 6 и 11, рис. 2, треки 1, 2, 8 и 9), было установлено, что ДНК мегаплазмиды рСА16-1 и бактериофага NF16 отличаются по первичной последовательности и не содержат идентичных по подвижности фрагментов ДНК.

Сравнение картин рестрикции генома бактериофага NF16 и генома другого эрвиниофага ZF40/421 для эндонуклеаз *HpaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* и *HindIII* показало, что геном бактериофага NF16 фракции NF16/0,4 М NaCl совпадает по рестрикционной картине с геномом фага ZF40/421 (рис. 2). На треках видно, что геномы обоих фагов содержат идентичные фрагменты ДНК, однако на рестрикционной картине

фага NF16 фракции NF16/0,25 М NaCl в верхних частях треков имеются также дополнительные фрагменты ДНК (рис. 2, треки 1, 4, 8, 12 и 15), которые, возможно, отражают разный характер пермутаций их первичных последовательностей [1].

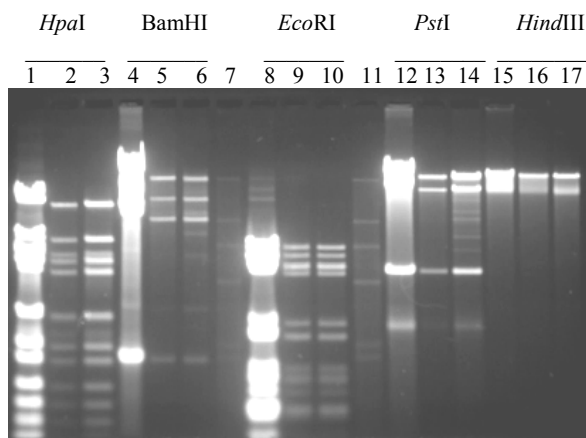


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов рестрикции ДНК бактериофагов NF16 и ZF40/421 *E. carotovora*: 1, 4, 8, 12, 15 – NF16 / 0,25 М NaCl; 2, 5, 9, 13, 16 – NF16 / 0,4 М NaCl; 3, 6, 10, 14, 17 – ZF40/421; контроль 7, 11 –  $\lambda$  / *HindIII*

Fig. 2. The electrophoregram of the restriction fragments of the DNA of *E. carotovora* bacteriophages NF16 and ZF40/421: 1, 4, 8, 12, 15 – NF16 / 0,25 М NaCl; 2, 5, 9, 13, 16 – NF16 / 0,4 М NaCl; 3, 6, 10, 14, 17 – ZF40/421; control 7, 11 –  $\lambda$  / *HindIII*

Таким образом, в отличие от плазмид *E. carotovora* размером около 10 т.п.н., имеющих схожие картины рестрикции [2], все исследованные нами мегаплазмиды эрвиний представлены уникальными последовательностями.

Рестрикционный анализ выявил, что геномы мегаплазмиды рСА16-1 и бактериофага NF16 не содержат идентичных рестрикционных фрагментов ДНК. Однако это не исключает возможной причастности мегаплазмид других штаммов эрвиний к профаговым элементам полилизогенной бактерии *E. carotovora*.

Работа выполнена при поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований (проект Ф25/134-2008) и МОН Украины (проект НУ/448-2009).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Панцина А.И., Товкач Ф.И. Внутригеномная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2006. – Т. 68, № 6. – С. 35-43.
2. Сергеева Ж.Ю., Товкач Ф.И. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* // Доповіді НАН України. – 2008. – № 12. – С. 149-153.
3. Товкач Ф.И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 804 – 810.
4. Товкач Ф.И., Григорян Ю.А., Рубан В.И., Данилейченко В.В., Кишко Я.Г. Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia carotovora* // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. – 1988. – № 1. – С. 20-24.
5. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. – 1981. – V. 145, № 3. – P. 1365-1373.
6. Vivian A., Murillo J., Jackson R. W. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 763-780.



**Ж.Ю. Сергєєва<sup>1</sup>, Ф.І. Товкач<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,  
Одеса, 65082, Україна, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул.  
Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## **ПОРІВНЯЛЬНИЙ РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ДНК МЕГАПЛАЗМІД І БАКТЕРІОФАГІВ *ERWINIA CAROTOVORA***

### **Реферат**

В результаті проведеного рестрикційного аналізу ДНК мегаплазмід, отриманих з різних штамів фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora*, показано, що усі досліджені плазміди представлені унікальними послідовностями. Порівняльний аналіз картин рестрикції мегаплазмід рСА16-1 і бактеріофага NF16 *E. carotovora* штаму 33А виявив відсутність співпадінь плазмідної і фагової ДНК за первинною послідовністю.

**К л ю ч о в і с л о в а:** *Erwinia carotovora*, мегаплазмід, бактеріофаги, рестрикційний аналіз.

**Zh.U. Sergeeva<sup>1</sup>, F.I. Tovkach<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2,  
Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup> Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
Acad. Zabolotno str., 154, Kyiv, 03143, Ukraine, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## **THE COMPARATIVE DNA RESTRICTION ANALYSIS OF *ERWINIA CAROTOVORA* MEGAPLASMIDS AND BACTERIOPHAGES**

### **Summary**

As the result of the restriction analysis of the DNA of phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* megaplasmids from different strains it has been shown that all the studied plasmids are represented with the unique sequences. The comparative analysis of the restriction sites of *E. carotovora* pCA16-1 megaplasmid and NF16 bacteriophage from the strain 33A has detected that plasmid and phage DNAs differ in primary sequences.

**К e y w o r d s:** *Erwinia carotovora*, megaplasmids, bacteriophages, restriction analysis.

