

бодных аминокислот в клеточном пуле и препятствовала достижению их максимального выхода в условиях пермеабилзирующего действия  $O_3$ . В целом количественная оценка  $O_3$ -индуцированного накопления аминокислот дрожжами показывает их близкое совпадение с найденными в литературе данными о величине свободного аминокислотного пула в нативных клетках. Последнее позволяет считать, что выход аминокислот у обработанных озоном дрожжей связан с нарушением барьерной функции плазматической мембраны, а не с окислительным гидролизом эндогенных белков.

[1] Безбородов А.М. "Метаболиты внутриклеточного фонда микроорганизмов". М., "Наука", 1974, с. 8-40

УДК 557.21.044.14

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ N

**Смотрин С.Ф., Бурлаков С.П., Белясова Н.А., Гриц Н.В.**

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Стрептококки группы N используются в качестве заквасочных культур при производстве кисломолочных продуктов. Известно, что детерминанты, определяющие метаболизм лактозы, протеиназную активность и утилизацию цитрата [1] наследуются нестабильно и вызывают проблемы, связанные со сквашиванием молока, поэтому существует потребность в получении новых, усовершенствованных штаммов, характеризующихся высокой продуктивностью и комплексом производственно ценных свойств.

В последнее время, в связи с достигнутым прогрессом в области технологии рекомбинантных ДНК, для конструирования производственных штаммов-продуцентов биологически активных веществ все чаще применяются методы конструирования штаммов *in vitro*. Применение методов генной инженерии для конструирования высокопроизводительных штаммов молочнокислых стрептококков ограничено из-за отсутствия методов эффективного выделения ДНК из клеток этих бактерий, что объясняется особенностью строения клеток молочнокислых стрептококков.

Целью настоящего исследования являлась оптимизация методов выделения нативной плазмидной ДНК бактерий рода *Streptococcus*.

Для решения поставленной задачи был использован подход, включающий в себя модификацию существующих методов выделения ДНК из клеток бактерий и адаптацию подходящих методов применительно к молочнокислым стрептококкам (использование метода, предложенного Klaenhammer с соавт. [2], заключающемся в обработке клеток *Streptococcus lactis* исходного дикого типа лизоцимом в течении 7 минут при температуре 37 °С, не позволило выделить плазмидную ДНК (рис., трубка 1)).

Для эксперимента были использованы штаммы *Streptococcus lactis* L4.2 и *Escherichia coli* C600 F'lac, который планировалось использовать в качестве контроля.

Для разделения и визуализации полученной плазмидной ДНК использовался метод электрофореза в агарозном геле.

Для электрофореза использовался стандартный прибор, в котором вертикально расположены 10 трубок с агарозным гелем. Концентрация агарозы в геле варьировалась от 0,25 до 1,5% в стандартном трис-боратном буфере для электрофореза. Наиболее удобной для применения в нашем эксперименте оказалась концентрация 0,7% агарозы. Для лучшего разделения плазмид производилось варьирование силы тока от 0,5 до 5 мА на трубку и сила тока 2,5 мА на трубку оказалась удобной, так как за довольно короткий промежуток времени в 2 часа получалось хорошее разделение плазмид. По окончании электрофореза гель помещаем в раствор бромистого этидия с концентрацией 0,5 мкг/мл на 30 минут. Плазмидную ДНК выявляем в УФ-спектре.

В следующей серии экспериментов время обработки клеточной суспензии лизоцимом было увеличено до 20 минут, так как малый выход плазмидной ДНК был связан, по нашему мнению, с недостатком времени для формирования протопластов. На электрофореграмме присутствовали 2 полосы, характерные для плазмидной ДНК (рис., трубка 2). Дальнейшее увеличение времени воздействия лизоцимом недопустимо, так как согласно имеющимся литературным сведениям [2] обработка лизоцимом свыше 20 минут может приводить к утрате некоторых плазмид, находящихся в виде релаксационных комплексов с различными внутриклеточными нуклеазами. Поэтому для дальнейшего увеличения выхода ДНК было необходимо использовать другой подход.

После всестороннего рассмотрения имеющихся вариантов был сделан выбор в пользу предварительной обработки клеток молочнокислых стрептококков тиоловыми соединениями, в частности β-меркаптоэтанолом, так как имелись многочисленные экспериментальные данные и разработки, подтверждающие высокую эффективность этого вещества в данных целях [3]. Условия обработки клеток лизоцимом не изменялись. Электрофоретический анализ позволил обнаружить наличие тех же двух плазмидных полос (рис., трубка 2).

Поскольку при выделении ДНК по используемой методике открытые кольцевые молекулы связываются с SDS и в дальнейшем осаждаются, то для того, чтобы исключить это явление, было предложено вводить в реакционную среду ингибитор нуклеаз диэтилпирокарбонат. Кроме того, были внесены изменения в процедуру очистки осветленного лизата. Согласно произведенным изменениям, обработка лизата ферментом РНК-азой

проводилась до стадии осаждения белков, что позволило получить более чистый препарат плазмидной ДНК. Электрофоретический анализ полученной пробы показал наличие 5 плазмидных полос (рис., трубка 3). Кроме ранее наблюдаемых двух крупных плазмид, были визуализированы 3 плазмиды, имеющие меньшую молекулярную массу.

Таким образом, можно заключить, что метод выделения плазмидной ДНК у бактерий рода *Streptococcus*, включающий в себя разрушение клеточной стенки предварительно обработанных  $\beta$ -меркаптоэтанолом клеток лизоцимом в течение 20 минут при температуре 37 °С в присутствии ингибитора нуклеаз диэтилпиокарбоната, является наиболее эффективным применительно к молочнокислым стрептококкам. Применение этого метода позволяет получать препарат плазмидной ДНК с высоким выходом и содержащий широкий спектр характерных для молочнокислых стрептококков плазмид.



Рис. Результаты гель-электрофореза выделенной ДНК бактерий *Str.lactis* L4.2

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kondo J., McKay L. Gene transfer systems and molecular cloning in group N Streptococci: a review // *J.of Dairy Science.*-1985.-V.68.-N.9. -P.2143-2159.
2. Klaenhammer T.R., McKay L.L., Baldwin K.A. Improved lysis of group N Streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid // *Appl. and Envir. Microbiol.* - 1978. - V. 35. - №3. - P. 592-600.
3. Стоянова Л.Г., Егоров Н.С. Некоторые аспекты получения протопластов у *Streptococcus lactis* // *Прикладная биохимия и микробиология.* - 1990. - Т.26 - №4. - С.566-572.

УДК 579.8.017.6:577.152

### ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНЫХ ЦЕПЕЙ У БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Сокольчик Т.И., Селицкая Л.А., Леонтьев В.Н.

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Как известно, клетки микроорганизмов обладают гибким метаболизмом и способны к значительным перестройкам окислительного обмена веществ в ответ на изменение условий их культивирования. Наибольшим изменениям подвергается активность ферментов микросомальных и пероксисомальных систем окисления, обеспечивающих начальные этапы ассимиляции источников углерода в реакциях гидроксирования различных по химической природе соединений и перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот [1].

В связи с этим, для изучения особенностей функционирования монооксигеназных ферментных систем в клетках углеводородокисляющих микроорганизмов, а также для понимания действия факторов внешней среды на физиолого-биохимический статус микробных клеток, представлялось целесообразным исследовать влияние условий культивирования (типа субстрата, фазы роста микроорганизмов) на уровень ключевых ферментов окисления углеводов у бактерий рода *Pseudomonas*.

Исходя из механизма действия цитохром Р-450-содержащей гидроксильной ферментной системы [2], а также с целью изучения редокс-цепей переноса электронов, функционирующих при окислении различных углеводов микробными клетками, нами были измерены активности оксидоредуктаз в клетках бактерий