

Н. А. Белясова, доцент; А. Е. Крогочич, аспирант; А. П. Райский, студент; Н. В. Гриц, доцент

ПОЛУЧЕНИЕ ВАРИАНТОВ ЛАКТОКОККОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОДИН ТИП ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Under protoplast fusion has been obtained 2 *Bacillus subtilis* strains, one of which inherited single plasmid (3,3 MDa) and the second – two plasmids (1,8 and 3,3 MDa) from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 149 cells.

Плазмиды представляют собой небольшие чаще кольцевые молекулы ДНК, способные к автономной репликации. Это именно те молекулярные структуры, на основе которых создано большинство клонирующих векторов. Иначе говоря, с помощью плазмид можно переносить отдельные гены из клеток одних организмов в клетки других, конструировать рекомбинантные ДНК, создавать библиотеки геномов и совершать другие генноинженерные манипуляции.

Плазмиды встречаются практически у всех представителей рода *Lactococcus*. В одной клетке лактококков может содержаться одновременно несколько плазмид, чаще всего от 4 до 7 [1]. Их молекулярная масса варьирует от 1 до 80 МДа.

Для детального исследования плазмидной ДНК, что требуется при конструировании клонирующих векторов, необходимо выделить из клеток достаточно большое ее количество. Причем это должна быть лишь ДНК одного типа. Таким образом, возникает задача получения штаммов лактококков, наследующих только один тип плазмидной ДНК.

Для уменьшения числа плазмид в клетках бактерий прибегают к использованию элиминирующих факторов. Их действие основано на предпочтительном связывании с плазмидной ДНК и нарушении процесса автономной репликации [2]. В результате при делении клетки плазида наследуется только одной из двух образующихся бактерий, т. е. в популяции постепенно увеличивается число вариантов, утративших те или иные плазмиды. В экспериментах по элиминации плазмид из клеток различных штаммов лактококков использовали следующие факторы: обработку клеток акридиновым оранжевым, акрифлавином, бромистым этидием, инкубирование при повышенной температуре [3], а также их сочетание. В результате удалось добиться элиминации только четырех плазмид из клеток штамма *L. lactis* ssp. *lactis* 631/1 (см. рисунок).

Еще одним подходом к достижению заданной цели может служить перенос плазмид из клеток лактококков в клетки бесплазмидных штаммов. В качестве реципиента был выбран бесплазмидный штамм *Bacillus subtilis* 168 *trpA*. Компетентные клетки бацилл были трансформированы плазмидной и тотальной ДНК *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Однако попытки отобрать в этих экспериментах бактерии *Bacillus*

subtilis, наследующие плазмиды лактококков, оказались нерезультативными.

631/1 32м 32к Ф129 509 Ф10у

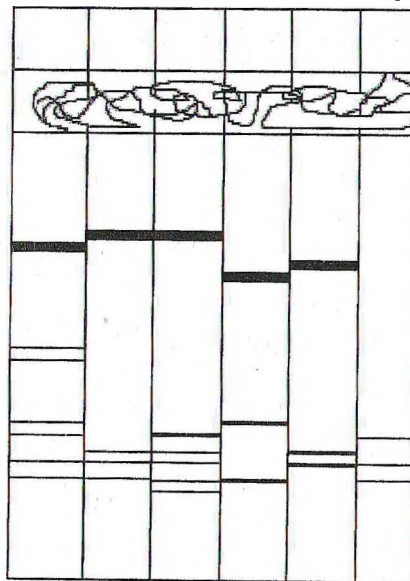


Рисунок. Плазмидный состав вариантов штамма *L. lactis* subsp. *lactis* 631/1, полученных под воздействием различных элиминирующих агентов

На следующем этапе были предприняты попытки осуществить слияние протопластов лактококков и бактерий *B. subtilis* 168. Для этого из числа охарактеризованных штаммов *L. lactis* выбрали те, которые отличались множественной устойчивостью к антибиотикам (табл. 1).

Устойчивость *L. lactis* ssp. *lactis* 149 к хлорамфениколу и канамицину и устойчивость *L. lactis* ssp. *lactis* 05 к стрептомицину, хлорамфениколу и канамицину использовали в качестве селективного фактора для отбора продуктов слияния – фузантов. Контрелекцию донорских клеток (штаммы лактококков, наследующие плазмиды) осуществляли с помощью факторов питательной среды: высев фузантов производили на такую среду, которая обеспечивает рост бактерий *B. subtilis* 168, но не лактококков. В табл. 2 представлены результаты одного из эффективных экспериментов по слиянию протопластов *B. subtilis* 168 и *L. lactis* subsp. *lactis* 149.

Таблица 1

Отличительные свойства бактерий *B. subtilis* 168 и штаммов лактококков

Бактерии	Отношение к антибиотикам в различных концентрациях (мкг/мл)							
	Стрептомицин		Бензилпенициллин		Хлорамфеникол	Полимиксин	Рифампицин	Канамицин
	50	100	50	100	5	70	5	50
<i>B. subtilis</i> 168	s	s	s	s	s	s	s	s
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 149	s	s	s	s	r	r	s	r
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 05	r	r	r	r	r	r	s	r
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 116	s	s	s	s	r	r	s	r
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 112	s	s	s	s	r	r	s	r
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 140	s	r	s	r	r	r	s	s
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 124	s	s	s	s	r	r	s	r

Таблица 2

Эффективность слияния протопластов *B. subtilis* 168 и *L. lactis* ssp. *lactis* 05

Параметры	$K_{исх}$	$K_{осм}$	$K_{рев}$
Концентрация клеток <i>B. subtilis</i> 168 $См^2$, кл./мл	$5,6 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^8$
Концентрация клеток <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 149 $См^2$, кл./мл	$3,8 \cdot 10^9$	$9,6 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^8$
Концентрация фузантов <i>B. subtilis</i> 168 $См^2$ (КФ), кл./мл	—	—	$2,1 \cdot 10^4$
Эффективность образования протопластов <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 149 (ЭОП ₁), %	$ЭОП_1 = (1 - K_{осм}/K_{исх}) \cdot 100 = 99,7\%$		
Эффективность образования протопластов <i>B. subtilis</i> 168 (ЭОП ₂), %	$ЭОП_2 = (1 - K_{осм}/K_{исх}) \cdot 100 = 99,9\%$		
Эффективность реверсии протопластов <i>B. subtilis</i> 168 (ЭРП), %	$ЭРП = [(K_{рев} - K_{осм})/(K_{исх} - K_{осм})] \cdot 100 = 6,6\%$		
Эффективность слияния протопластов (ЭСП), кл./кл. рев.	$ЭСП = (КФ/К_{рев}) \cdot 100 = 1,9 \cdot 10^{-2}$ кл./кл. рев.		

Примечание. $K_{исх}$ – исходная концентрация клеток; $K_{осм}$ – концентрация клеток, не образовавших протопласты, после воздействия лизоцима на клетки; $K_{рев}$ – концентрация ревертантов.

У выделенных фузантов *B. subtilis* 168 был проанализирован плазмидный состав. В клетках одного из исследуемых фузантов *B. subtilis* 168-1 присутствовали две плазмиды молекулярной массой 1,8 и 3,3 МДа, а в клетках пяти полученных фузантов была визуализирована только одна плаزمида молекулярной массой 3,3 МДа.

Литература

1. Белясова Н. А., Кротович А. Е., Лапаник О. И., Гриц Н. В. Анализ наследования плазмид бактериями рода *Lactococcus* // Труды

БГТУ: Сер. IV. Химия и технология орган. в-в. – Мн.: БГТУ, 2004. – Вып. XII. – С. 189–192.

2. Белясова Н. А. Биохимия и молекулярная биология: Учеб. пособие. – Мн.: Книжный Дом, 2004. – 416 с.

3. Смотрич С. Ф., Дубатовка С. И., Белясова Н. А., Гриц Н. В. Оптимизация метода получения бесплазмидных вариантов бактерий рода *Lactococcus* // Разработка импортозамещающих технологий и материалов химической промышленности: Матер. конф. – Мн., 1999. – С. 250–252.