

УДК: 615.33:577.182.

## ОТРИМАННЯ ТА ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПРОТОПЛАСТІВ ШТАМУ *STREPTOMYCES NOGALATER* ІМЕТ43360

О. Аравіцька, Д. Климишин, О. Громико, В. Федоренко

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua

Для продуцента ногаламіцину штаму *S. nogalater* ІМЕТ43360 опрацьовано умови отримання та регенерації протопластів. Показано, що найвища частота отримання і регенерації протопластів цього штаму спостерігається при культивуванні культури протягом 72 год у середовищі YEME з 1% гліцину. Досліджено, що зростання часу інкубації міцелію до 60 хв у буфері для лізису, що містить лізоцим у кінцевій концентрації 2 мг/мл, є найефективнішими умовами для отримання протопластів *S. nogalater* ІМЕТ43360. Проведено ПЕГ-залежну трансформацію отриманих у роботі протопластів та досліджено частоту отримання трансформантів.

**Ключові слова:** *Streptomyces nogalater*, ногаламіцин, трансформація, регенерація протопластів.

Штам *S. nogalater* ІМЕТ43360 є продуцентом промислового протипухлинного антибіотика ногаламіцину (рис. 1). Ногаламіцин – антрацикліновий антибіотик, активний щодо багатьох грам-позитивних бактерій, а також деяких видів пухлин [10]. Завдяки високій активності щодо низки пухлинних ліній, а також низькій токсичності, його похідні знайшли застосування у хіміотерапії раку [10, 13, 14].

Для успішного використання сучасних методів генетичної інженерії у вивченні генетичного контролю біосинтезу антибіотиків, у тому числі і ногаламіцину, необхідно володіти ефективними методиками введення рекомбінантних молекул ДНК у клітини цих штамів. На сьогоднішній день для багатьох штамів такі методики не є достатньо успішними, що створює серйозні перешкоди як для вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотиків, так і для їхнього генно-інженерного застосування [2, 4, 11]. Розробка ефективних методів введення екзогенних молекул ДНК дала б змогу подолати ці проблеми, а також повною мірою використати сучасні генетичні підходи з метою конструювання штамів актиноміцетів, зокрема і штаму *S. nogalater*.

Трансформація протопластів є найпоширенішою процедурою введення рекомбінантних молекул ДНК у клітини бактерій роду *Streptomyces* [3, 5, 6, 8]. Методики отримання і трансформації протопластів розроблені для таких модельних штамів актиноміцетів, як *S. coelicolor* та *S. lividans*. Проте для більшості інших штамів вони потребують значних модифікацій.

Метою цієї роботи є підбір оптимальних умов для отримання протопластів штаму *S. nogalater* ІМЕТ43360, а також генетична трансформація цих протопластів векторами, що є поширеними у генній інженерії актиноміцетів.

У роботі використовували штам дикого типу *S. nogalater* ІМЕТ43360 (продуцент ногаламіцину), а також *E. coli* DH5 $\alpha$  F-80d (*lacZM15*)/*recA1*/*endA1*/*gyrA96thi1*(*lacZYA-argF*)/*u169*). Штами *S. nogalater* ІМЕТ43360 та *E. coli* DH5 $\alpha$  зберігаються в колекції ку-

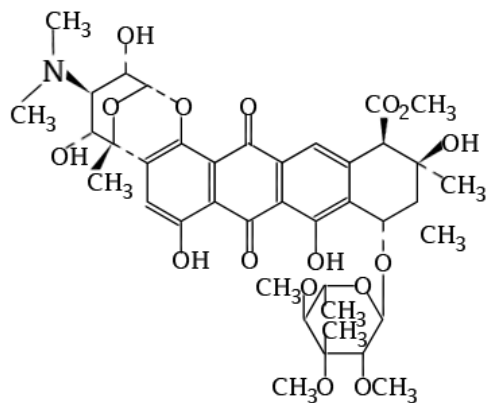


Рис. 1. Структурна формула ногаламіцину.

рKC1218E [9], pSET152 [2, 9], pVWB [2], pSOK101 [7], pKC1139 [9].

Отримання і трансформацію протопластів проводили за методиками [5, 9], модифікованими нами в ході роботи. Утворення протопластів спостерігали під електронним мікроскопом при збільшенні 5500–6000.

Виділення препаратів сумарної та плазмідної ДНК, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції, електрофоретичний аналіз ДНК, проводили за [5, 9]. Трансформацію *E. coli* проводили згідно зі стандартною “кальцієвою” методикою [5].

Існує багато факторів, які мають важливе значення для отримання та регенерації протопластів, а також їхньої трансформації [3, 5, 6, 9, 12]. До них належать: стадія росту культури, що використовується для протопластування, температура, при якій інкубують міцелій і протопласти, склад регенераційного середовища тощо.

З метою підбору оптимального середовища для культивування міцелію *S. nogalater* IMET43360 нами було використано такі рідкі поживні середовища: YEME, TSB, SG, SGGP, SGYEME. У середовищах SG, SGGP і TSB культура росла недостатньо однорідно, що ускладнювало подальші маніпуляції з біомасою, а в середовищі SGYEME ріст культури був майже відсутній. Отже, в нашій роботі ми використали середовище YEME, культура в якому характеризувалася оптимальним ростом для подальшого отримання протопластів.

Одним із чинників, що може суттєво впливати на частоту отримання протопластів, а також частоту їхньої трансформації, може бути вік і фізіологічний стан міцелію. Так, найвищою є частота трансформації та трансдукції протопластів *S. lividans*, отриманих із міцелію, що перебуває у пізній експоненціальній фазі росту культури (36–40 год) [9].

Оскільки час культивування культури та умови лізису є ключовими процесами у процедурі отримання протопластів, і саме від цих етапів залежить частота утворення протопластів, нами були підібрані концентрація лізоциму у буфері для лізису та час вирощування культури.

З метою визначення оптимального часу вирощування культури ми інкубували міцелій 48 та 72 год при температурі 30°C. Лізоцим використовували у концентрації 2 мг/мл, лізис проводили протягом 20–60 хв. Зростання часу інкубації міцелію до 72 год у буфері для лізису, що містить лізоцим у кінцевій концентрації 2 мг/мл, приводить до зростання частоти отримання протопластів. З табл. 1 видно, що внаслідок підвищення концентрації гліцину в середовищі YEME від 0,1 до 1% зростає титр регенованих протопластів і ефективність регенерації.

льтур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка. Штами актиноміцетів вирощували на вівсяному середовищі [5] при температурі 28°C, а *E. coli* – на LA та LB при температурі 37°C [5].

Міцелій для отримання протопластів вирощували в рідких середовищах YEME, TSB, SG, SGGP, SGYEME [5, 9]. Регенерацію протопластів проводили на середовищі R2YE [9].

Для трансформації протопластів *S. nogalater* використано вектори

Умови регенерації протопластів *S. nogalater* ІМЕТ43360

| Час інкубування культури, год | Концентрація гліцину, % | Титр регенерованих протопластів     | Ефективність регенерації, % |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 48                            | 0,1                     | $0,3 \times 10^4 - 0,2 \times 10^5$ | 0,005                       |
|                               | 0,5                     | $0,1 \times 10^5$                   | 0,005                       |
|                               | 1,0                     | $0,1 \times 10^6$                   | 0,006                       |
| 72                            | 0,1                     | $0,6 \times 10^4 - 0,2 \times 10^5$ | 0,004                       |
|                               | 0,5                     | $0,1 \times 10^4 - 0,2 \times 10^6$ | 0,01                        |
|                               | 1,0                     | $0,5 \times 10^6$                   | 0,6                         |

Отже, для отримання протопластів культуру *S. nogalater* ІМЕТ43360 ми вирощували протягом 72 год з 1% гліцину у середовищі YEME. Титр регенерованих протопластів у цих умовах становив  $0,2-0,5 \times 10^6$ , а ефективність регенерації – 0,6%, що є достатнім для подальших маніпуляцій із використанням протопластів і не суперечить літературним даним із розробки методик отримання та регенерації протопластів модельних штамів *S. coelicolor* A3(2) і *S. lividans* 66 [9, 12]. Відомо, що високий титр протопластів, здатних до регенерації, є важливою умовою успішного введення рекомбінантних плазмід у ці штами шляхом їхньої трансформації [7–9].

Існує декілька методів перенесення рекомбінантних молекул ДНК у клітини стрептоміцетів: ПЕГ – залежна трансформація протопластів плазмідами, космідами та хромосомною ДНК, кон'югаційне перенесення плазмід із *E. coli*, фагова трансдукція [5, 9]. Останній метод не знайшов широкого застосування у генетиці актиноміцетів, що пов'язане з малою кількістю фагів, здатних інфікувати широке коло господарів [9]. На сьогоднішній день методика перенесення екзогенних молекул ДНК шляхом кон'югації з *E. coli* у клітини різних штамів стрептоміцетів є оптимізованою для цілої низки штамів [2, 11]. Найбільш розповсюдженим шляхом перенесення ДНК у клітини стрептоміцетів залишається ПЕГ-залежна трансформація протопластів [8, 9]. Висока частота отримання рекомбінантних штамів із використанням цієї методики залежить від багатьох факторів: температури та часу інкубування міцелію, складу середовищ для вирощування міцелію та регенерації протопластів [5, 9].

У нашій роботі з метою трансформації протопластів *S. nogalater* було використано вектори, що здатні до автономної реплікації в клітинах актиноміцетів, а також вектори, яким властива сайт-специфічна інтеграція в хромосому досліджуваних штамів. Використання широкого кола реплікативних плазмід пояснюється тим, що дані плазміди містять різні реплікони та мають різну копійність у клітинах [2]. Такі особливості автономних плазмід можна успішно використовувати у різних цілях: для введення додаткових копій генів, спрямованої інактивації генів тощо. Вибір інтегративних векторів пов'язаний з тим, що плазміди, створені на основі реплікативних автономних векторів, нестабільно успадковуються за відсутності селективного тиску [2, 7]. Крім цього, використання плазмід, здатних до автономної реплікації, ускладнюється структурними перебудовами векторів у реципієнтних клітинах, тоді як для більшості плазмід, яким властива сайт-специфічна інтеграція, вектори можуть стабільно підтримуватися навіть за відсутності селективного тиску. Широке коло актиноміцетних штамів, у хромосомах яких відбувається сайт-специфічна інтеграція, відкриває перспективи для використання інтегративних плазмідних векторів у генно-інженерних маніпуляціях з метою конструювання штамів продуцентів нових антибіотиків.

Трансформацію протопластів *S. nogalater* проводили за описаною методикою [5, 9]. Протопласти трансформували одразу ж після їхнього отримання. До суспензії протопластів спочатку додавали 1 мкг ДНК, а потім ПЕГ1000, розчинений у Р-буфері. У процедурі трансформації протопластів *S. nogalater* нами було використано ПЕГ1000 у концентрації 25%. Для штамів *S. lividans* та *S. coelicolor* показано, що за таких умов злиття протопластів відбувається рідко [5, 9]. Це свідчить про те, що воно не є передумовою поглинання протопластами екзогенної ДНК.

Суміш трансформованих протопластів висівали на регенераційне середовище. На це ж середовище висівали нетрансформовані протопласти для визначення загального титру протопластів і нелізованих клітин у суспензії. Селекцію плазмід здійснювали за стійкістю до апраміцину.

Частота утворення трансформантів у розрахунку на 1 мкг ДНК автономних реплікативних плазмід становила:  $2,0 \times 10^{-7}$  для рSOK101,  $2,4 \times 10^{-7}$  для рKC1139 та  $3,1 \times 10^{-7}$  для рKC1218E (табл. 2). У декількох незалежних експериментах нам не вдалося отримати трансформантів, що містять плазмід рSET152 та рVWB.

Для підтвердження факту присутності плазмід, здатних до автономної реплікації, у клітинах реципієнтного штаму *S. nogalater*, було здійснено трансформацію клітин *E. coli* DH5 $\alpha$  сумарною ДНК із клітин отриманих трансформантів з їхнім подальшим картуванням за допомогою рестриктаз. Результати рестрикційного аналізу підтвердили наявність цих плазмід у клітинах трансформантів.

Така низька частота трансформації протопластів *S. nogalater* є недостатньою для повноцінного вивчення цього штаму. Для порівняння частота отримання трансформантів модельного штаму *S. lividans* ТК64 становить близько  $10^5$  трансформантів на 1 мкг ДНК плазмід рIJ702. Подібні проблеми з використанням трансформації протопластів описані для багатьох штамів актиноміцетів [8, 9].

Одержані дані вказують на те, що процедура перенесення екзогенних молекул ДНК у клітини *S. nogalater* шляхом трансформації протопластів є малоєфективною для генно-інженерного вивчення генетичного контролю біосинтезу ноґаламіцину. Можна припустити, що низька частота утворення трансформантів пов'язана із потужними системами рестрикції, що характерні для багатьох штамів стрептоміцетів. Необхідно зазначити, що крім низької ефективності трансформації протопластів багатьох штамів актиноміцетів, сам процес протопластування може виступати фактором, який спричиняє нестабільність геному актиноміцетів, що позначається на результатах досліджень. Такі ускладнення можна подолати, використовуючи альтернативні методики введення екзогенних молекул ДНК у клітини *S. nogalater*. Нами раніше показано [1], що методика кон'югаційного перенесення в системі *E. coli* – *Streptomyces* є ефективною

Таблиця 2

Частота отримання трансформантів *S. nogalater* IMET 43360

| Назва штаму                    | Антибіотик, який продукує штам | Частота утворення трансформантів/мкг ДНК |                      |                      |                  |
|--------------------------------|--------------------------------|--|----------------------|----------------------|------------------|
|                                |                                | рKC1139                                  | рSOK101              | рKC1218E             | рVWB,<br>рSET152 |
| <i>S. nogalater</i> IMET 43360 | Ноґаламіцин                    | $2,4 \times 10^{-7}$                     | $2,0 \times 10^{-7}$ | $3,1 \times 10^{-7}$ | Не отримано      |

для введення широкого спектру реплікативних та інтегративних плазмід у клітини *S. nogalater*. У наших дослідженнях частота отримання екскон'югантів коливалась у межах від  $(5,4 \pm 0,3) \times 10^{-5}$  до  $(3,2 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ . Таким чином, порівняно з кон'югацією з *E. coli*, ПЕГ-залежна трансформація протопластів *S. nogalater* відбувається зі значно нижчою частотою, що не дає змоги у повному обсязі застосовувати цей метод для генноінженерного конструювання продуцента ноґаламіцину.

1. Климишин Д., Громико О., Федоренко В. Використання міжродової кон'югації *Escherichia coli* – *Streptomyces* для перенесення рекомбінантних ДНК в штам *Streptomyces nogalater* IMET 43360 // Цитологія і генетика. 2007. Т. 41. № 5. С. 263–267.
2. Лужецький А. Н., Остап Б. Е., Федоренко В. А. Междовая конъюгация *Escherichia coli* – *Streptomyces globisporus* 1912 с использованием интегративной плазмиды pSET152 и ее производных // Генетика. 2001. Т. 37. № 10. С. 1340–1347.
3. Федоренко В. О., Остап Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Вид. центр ЛНУ, 2007. 277 с.
4. Baltz R. H. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Trends Microbiol. 1998. Vol. 6. P. 76–83.
5. Bibb M. J., Ward J. M., Hopwood D. A. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency // Nature. 1978. Vol. 274. P. 398–400.
6. Fouces R., Rodriguez M., Mellado E. et al. Conjugation and transformation of *Streptomyces* species by tylosin resistance // FEMS Microbiol Lett. 2000. Vol. 15. P. 319–325.
7. Hopwood D. A., Kieser T., Lidiate D. J., Bibb M. J. *Streptomyces* plasmids: their biology and use as cloning vectors // In the Bacteria. 1986. Vol. 9. P. 159–222. London: Academic. 415 p.
8. Jamamoto H., Maurer H., Hutchinson C. G. Transformation of *streptomyces erythreus* // J. Antibiot. 1986. Vol. 39. P. 1304–1313.
9. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: John Innes Foundation, 2000. 634 p.
10. Li H., Krueger C. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // Pharmac. Ther. 1991. Vol. 51. P. 239–255.
11. Mazodier Ph., Peffer R., Thompson Ch. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 3583.
12. Okanishi M., Suzuki R., Umerawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplast: cultural conditions and morphological study // J. Gren. Microbiol. 1974. Vol. 80. P. 389–400.
13. Torkkell S., Kunnari T., Palmu K. et al. The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater*: characterization of 20-kb DNA region and generation of hybrid structures // Mol. Gen. Genet. 2001. Vol. 266. P. 276–288.
14. Ylihanko K., Tuikkanen J., Jussila S. et al. A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway // Mol. Gen. Genet. 1996. Vol. 251. P. 113–120.

**OBTAINING AND TRANSFORMATION OF *STREPTOMYCES NOGALATER* IMET43360 PROTOPLASTS'****O. Aravitska, D. Klymyshin, O. Gromyko, V. Fedorenko**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua*

For the nogalamycin producer strain, *S. nogalater* IMET43360, the conditions of obtaining and regeneration of protoplasts were elaborated. Indicated that the highest frequency of obtaining and regeneration of protoplasts are observed during the cultivating for 72 hours in YEME media containing 1% of glycine. The most effective conditions for protoplasts obtaining is the increasing of incubation time till 60 minutes with 2mg/ml lysozyme. PEG-depended protoplasts transformation has been done and frequency of obtaining transformants is determined.

*Key words:* *Streptomyces nogalater*, nogalamycin, transformation, protoplasts' regeneration.

Стаття надійшла до редколегії 11.07.08

Прийнята до друку 10.09.08