

Ж.Ю. Сергеева¹, Ф.И. Товкач²

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

²Институт 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

РЕСТРИКЦИОННОЕ КАРТИРОВАНИЕ ВНЕХРОМОСОМНОГО ЭЛЕМЕНТА pCA25 *ERWINIA CAROTOVORA*

Проведено физическое картирование внехромосомного элемента pCA25 Erwinia carotovora и его транспозонного варианта pCA25::Tn9. На основе полученных данных построена предварительная рестрикционная карта плазмиды и определено место встраивания транспозона в плазмидную ДНК.

К л ю ч е в ы е с л о в а: Erwinia carotovora, плазмиды, транспозон Tn9, рестрикционный анализ, рестрикционная карта.

Плазмиды размером 9,8 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и их делеционно-вставочные варианты представляют собой наиболее распространённую группу внехромосомных элементов, выявленных у *Erwinia carotovora*. Рестрикционный анализ этих внехромосомных ДНК с помощью эндонуклеаз *HpaI* и *EcoRV* показал, что они гомологичны по сайтам рестрикции [1]. Одним из наиболее изученных генетических элементов бактерии *E. carotovora*, размером 9,8 т.п.н., является плаزمида pCA25 [2].

Целью данного исследования было создание рестрикционной физической карты сайтов плазмиды pCA25 *E. carotovora* и её транспозонного варианта pCA25::Tn9 [3].

Материалы и методы

В работе были использованы штаммы *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48A (pCA25) и *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48A 7/4b (pCA25::Tn9).

Выделение плазмид из клеток *E. carotovora* проводили щелочным методом [4]. Полученные плазмидные ДНК осаждали этанолом и растворяли в воде. Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы *HpaI*, *BglI*, *EcoRI*, *EcoRV* и *PstI*. В качестве маркера размера использовали фрагменты ДНК фага λ, полученные с помощью эндонуклеаз *HindIII* и *PstI*.

Результаты и их обсуждение

На рестрикционной карте плазмиды pCA25::Tn9 показано, что все три сайта для рестриктазы *HpaI* расположены на небольшом расстоянии друг от друга, приводя, таким образом, при рестрикции к появлению одного большого и двух небольших фрагментов (рис.).



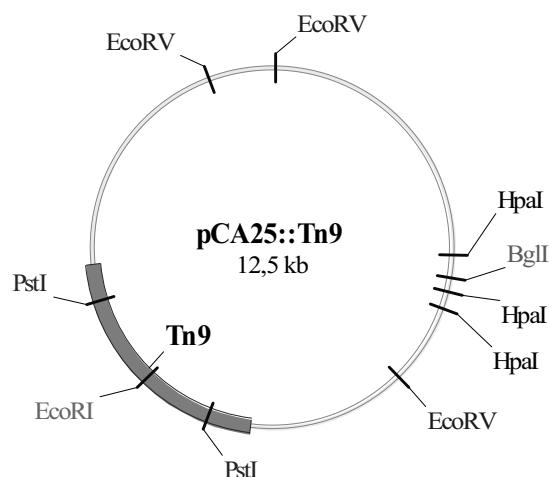


Рис. Рестрикционная карта плазмиды pCA25::Tn9

Fig. Restriction map of plasmid pCA25::Tn9

Сайт для эндонуклеазы *BglI* также расположен в этой области плазмидной ДНК между сайтами эндонуклеазы *HpaI* (рис.). Сайты для рестриктаз *HpaI* и *BglI* расположены в пределах фрагмента А *EcoRV*, непосредственно на небольшом расстоянии от одного из трёх сайтов эндонуклеазы *EcoRV*. Было установлено, что транспозон Tn9 встраивается в ДНК плазмиды pCA25 в фрагмент В *EcoRV*, также на небольшом расстоянии от сайта рестрикции *EcoRV* (рис.). Встраивание транспозона Tn9 только в определённую область ДНК плазмиды pCA25 было подтверждено при исследовании значительного числа клонов с плазмидой pCA25::Tn9, которые были получены независимо [2]. Сайты для рестриктаз *EcoRI* и *PstI* отсутствуют на ДНК нативной плазмиды pCA25. На ДНК транспозона Tn9 плазмиды pCA25::Tn9 имеется один сайт для *EcoRI*, расположенный в гене *CAT*, и два сайта для *PstI*, расположенные в пределах IS1 последовательностей транспозона Tn9.

Таким образом, в результате физического картирования плазмид pCA25 и pCA25::Tn9, была предложена рестрикционная карта криптической плазмиды *E. carotovora*, являющейся представителем наиболее распространённого размерного класса внехромосомных ДНК для данной бактерии. Благодаря наличию транспозонной метки в плазмиде стало возможным уточнение взаимного расположения сайтов рестрикции, а также местоположения транспозона Tn9 в плазмидной ДНК.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеева Ж.Ю., Товкач Ф.И. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* // Доповіді НАН України. — 2008. — № 12. — С. 149-153.
2. Бурова Л.М., Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Природа криптической плазмиды pCA25 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48A // Мікробіол. журн. — 2007. — т. 69, № 2. — С. 23-28.
3. Сергеева Ж.Ю., Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Мікробіол. журн. — 2006. — 68, №4. — С. 34-39.
4. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. — 1981. — 145, №3. — P. 1365-1373.



Ж.Ю. Сергєєва¹, Ф.І. Товкач²

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

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

РЕСТРИКЦІЙНЕ КАРТУВАННЯ ПОЗАХРОМОСОМНОГО ЕЛЕМЕНТА PCA25 *ERWINIA CAROTOVORA*

Реферат

Проведено фізичне картування позахромосомного елемента pCA25 *Erwinia carotovora* і його транспозонного варіанта pCA25::Tn9. На основі отриманих даних побудовано попередню рестрикційну карту плазмиди і виявлено місце вбудовування транспозона Tn9 в плазмідну ДНК.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, плазмиди, транспозон Tn9, рестрикційний аналіз, рестрикційна карта.

Zh.U. Sergeeva ¹, F.I. Tovkach²

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

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

RESTRICTION SITE MAPPING OF *ERWINIA CAROTOVORA* EXTRACHROMOSOMAL ELEMENT PCA25

Summary

The restriction site mapping of *Erwinia carotovora* extrachromosomal element pCA25 and its transposon variant pCA25::Tn9 has been carried out. The preliminary restriction map of the plasmid has been created and the site of the Tn9 transposon incorporation has been detected corresponding to the obtained data.

Key words: *Erwinia carotovora*, plasmids, transposon Tn9, restriction analysis, restriction map.

