

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д. К. ЗАВОЛОТНОГО

На правах рукопису

ЛУК'ЯНЧУК

Віталій Владиславович

КАРТУВАННЯ ХРОМОСОМИ *STREPTOMYCES ANTIBIOTICUS* - ПРОДУЦЕНТА  
ОЛЕАНДОМІЦИНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ЗЛИТТЯ ПРОТОПЛАСТІВ

03.00.07 - мікробіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата біологічних наук

КІЇВ - 1996

Дв. 35.662

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі генетики мікроорганізмів  
Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного  
НАН України.

**Науковий керівник** - доктор біологічних наук, професор  
член-кор. НАНУ Мацелюк Б. П.

**Офіційні опоненти** - доктор біологічних наук, професор  
Малота С. С.  
кандидат біологічних наук  
Муквич М. С.

**Провідна організація** - Київський Національний Університет  
ім. Т. Г. Шевченка

Захист відбудеться 16 жовтня 1996 року о 10<sup>00</sup> годині на  
засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 01.81.01 при Інституті  
мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України  
(252143, Київ 143, вул. Заболотного, 154, Інститут мікробіоло-  
гії та вірусології НАН України, зал засідань)

З дисертацією можна ознайомитись в науковій бібліотеці  
Інституту мікробіології та вірусології НАН України.

Автореферат розіслано "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1996 р.

Вчений секретар  
Спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

Пуріш Л. М.

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00759998 (4)

### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми :** Важливим етапом генетичних досліджень стрептоміцетів стала розробка методів отримання, злиття і регенерації протопластів. Відсутність у протопластів клітинної стінки дозволяє проводити їх злиття і регенерацію, а також генетичну трансформацію, трансфекцію і гібридизацію у штамів стрептоміцетів, які не мають або мають малоефективну систему кон'югативного переносу генетичного матеріалу. Застосування методів отримання, злиття і регенерації протопластів і подальшого генетичного аналізу потомства допомагає не тільки краще зрозуміти шляхи біосинтезу біологічно-активних речовин, в тому числі антибіотиків, та їх генетичного контролю, але і дає можливість одержання нових, гібридних або модифікованих антибіотиків у випадку злиття протопластів різних стрептоміцетів-продуцентів відомих антибіотиків. Інформація про локалізацію генів біосинтезу антибіотиків, разом з методами послідовного і локалізованого мутагенезу, сприяє більш легкій ізоляції мутантів з різними блоками на шляху біосинтезу антибіотиків. Знання про зчеплення генів біосинтезу з певними хромосомними маркерами, вивчення нових комбінацій генів відкривають перспективу одержання нових важливих метаболітів, перспективних для застосування в медицині, ветеринарії і сільському господарстві.

Одним із важливих для медицини макролідних антибіотиків є олеандоміцин, промисловий продуцент якого *Streptomyces antibioticus* до цих пір систематично не досліджувався з генетичної точки зору.

**Мета і завдання роботи :** Провести генетичне дослідження і побудувати попередню генетичну карту *Streptomyces antibioticus* промислового продуцента олеандоміцину.

**Для виконання роботи необхідно було вирішити такі задачі:**

- 1) підібрати оптимальні умови одержання стабільних протопластів і їх регенерації в міцеліальні клітини, провести злиття протопластів штамів, що несуть різні генетичні маркери, і в'яснити генетичну природу одержаного потомства;
- 2) провести аналіз гаплоїдних рекомбінантів і встановити порядок розташування генетичних маркерів на генетичній карті, проаналізувати гетероклони і встановити відстані в одиницях рекомбінації між зчепленими генами на генетичній карті.
- 3) з'ясувати наявність плазмід у *Streptomyces antibioticus* - продуцента олеандоміцину та провести рестрикційний аналіз тотальної ДНК штамів промислових продуцентів олеандоміцину;
- 4) з'ясувати можливість впливу плазмиди pSG1912-на біосинтез антибіотиків *Streptomyces antibioticus*.

**ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ:**

1. Побудована генетична карта *Streptomyces antibioticus*-продуцента олеандоміцину, яка має 13 локусів.
2. На основі аналізу гетероклонів встановлено віддалі між усіма сусідніми генетичними локусами на карті хромосоми, загальна довжина якої складає 215 одиниць рекомбінації.
3. Показано здатність плазмиди pSG1912 значно підвищувати синтез антибіотичної речовини оранжевого кольору з  $R_f$  0,95 у трансформантів *S. antibioticus* ЛС-ОЛ 1790, що може вказу-

вати на регуляторну роль плазмиди в експресії генів синтезу антибіотиків у стрептоміцетів.

### **Наукова новизна.**

Вперше побудована генетична карта *Streptomyces antibioticus*-продуцента олеандоміцину, на якій позначено 13 локусів. На основі аналізу гетероклонів встановлено віддалі між усіма сусідніми генетичними локусами на карті хромосоми, загальна довжина якої складає 215 одиниць рекомбінації.

В результаті проведеного рестрикційного аналізу тотальної ДНК штамів промислових продуцентів олеандоміцину *Streptomyces antibioticus* показано наявність ампліфікованих повторів і відсутність кореляції між кількістю останніх і антибіотичною активністю цих штамів.

Встановлено здатність плазмиди pSG1912 значно підвищувати синтез антибіотичної речовини оранжевого кольору з  $R_f$  0,95 у трансформантів *S. antibioticus* ЛС-ОЛ 1790, що може вказувати на регуляторну роль плазмиди в експресії генів синтезу антибіотиків у стрептоміцетів.

### **Практичне значення.**

На генетичній карті *S. antibioticus*-продуцента олеандоміцину розташовано 13 генетичних локусів, серед яких і локус *ole1*, що відповідає за синтез олеандоміцину. Інформація про локалізацію генів біосинтезу антибіотиків разом з методами послідовного і локалізованого мутагенезу сприяють більш легкій ізоляції мутантів з різними блоками на шляху біосинтезу антибіотиків. Знання про зчеплення генів біосинтезу з певними

хромосомними маркерами, вивчення нових комбінацій генів відкривають можливість одержання нових важливих метаболітів, перспективних для застосування в медицині, ветеринарії і сільському господарстві, за допомогою селекції більш продуктивних штамів і створення продуцентів нових гібридних антибіотиків шляхом злиття протопластів.

Виявлена здатність плазмиди pSG1912 відігравати регуляторну роль в експресії генів синтезу антибіотиків у стрептоміцетів.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації доповідалися і обговорювалися на VI з'їзді УТГіС (Полтава, 1992 р), на Першій генетичній конференції країн Балтики (Вільнюс, 1992), на I (Установчому) з'їзді УМО (Одеса, 1994), на 9 Міжнародному симпозиумі по біології актиноміцетів (Москва, 1994).

**Публікація результатів роботи.** Основні положення роботи викладені у 10 друкованих працях.

**Структура та об'єм роботи.** Дисертація складається із вступу, огляд літератури, експериментальної частини, результатів, їх обговорення, висновків та списку літератури, який включає 152 найменування. Робота викладена на 155 сторінках машинописного тексту і містить 21 малюнок та 23 таблиці.

## З М І С Т Р О Б О Т И

**Огляд літератури.** Викладені сучасні дані з питань генетичної рекомбінації, структури хромосомної та плазмідної ДНК стрептоміцетів. Розглянуті різні методи вивчення рекомбінації і генетичного картування стрептоміцетів, які показали високу ефективність при вивченні модельного лабораторного штаму *Streptomyces coelicolor* A3(2), дали можливість побудувати ге-

нетичні карти для відносно великої кількості видів роду *Streptomyces*. Наведені приклади застосування методів отримання, злиття і регенерації протопластів і подальшого генетичного аналізу потомства, які допомагають не тільки краще зрозуміти шляхи біосинтезу біологічно-активних речовин в тому числі антибіотиків, та їх генетичного контролю, але і дають можливість одержання нових, гібридних або модифікованих антибіотиків у випадку злиття протопластів різних стрептоміцетів-продуцентів відомих антибіотиків.

### Експериментальна частина.

**Матеріали і методи.** В роботі використано 17 штамів *Streptomyces antibioticus* (табл. N1). При картуванні геному використовувались генетично мічені штами *S. antibioticus* з колекції Ленінградського технологічного інституту, одержані під впливом нітровогуанідину, метилбіурету і УФ-опромінення, а також гаплоїдні рекомбіанти, виділені нами після злиття протопластів.

Середовища та умови культивування мікроорганізмів підбиралися відповідно до задач експерименту, враховуючи потреби мікроорганізмів (Маниатис и др., 1984; Okanishi et al., 1974; Norwood et al., 1985).

Виділення плазмідної та тотальної ДНК з клітин мікроорганізмів проводили за методами Бірнбойма і Долі та Кайзера (Birnboim and Doly, 1979; Kieser, 1984), в які було внесено деякі модифікації. Розділення тотальної ДНК та їх рестрикційних фрагментів, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції та лігування лігазою фага T4 проводили згідно керівництву Маниатиса (Маниатис и др., 1984).

Таблиця №1. Характеристика штамів *S. antibioticus*

Номер штама	Генетичний маркер	Фенотип (потреба в факторах росту)
31	met1 ole1	метіонін, блок у синтезі олеандоміцину
32	ilv2 pro1	Ізолейцин, валін, пролін
42	thr1 tet1	Треонін, стійкість до тетрацикліну
513	leu1 pdx1	Лейцин, піридоксин
8-36	ilv1 cyt1	Ізолейцин, валін, цитозин
31-31	met1 thr1	Метіонін, треонін
31-25	met1 pur1	Метіонін, пурін
45-141	ilv2 pro1	Ізолейцин, валін, пролін
47-10	nic1 his1	Нікотинамід, гістидин
47-55	nic1 leu1	Нікотинамід, лейцин
47-146	nic1 his1	Нікотинамід, гістидин
7	nic1 met1 thr1	Нікотинамід, метіонін, треонін
11891	прототроф,	Вихідний штам для селекції продуцентів олеандоміцину 80-100 од/мл
1790	прототроф,	продуцент олеандоміцину 650 од/мл
32-280	прототроф,	продуцент олеандоміцину 1250 од/мл
0Л-1	прототроф,	продуцент олеандоміцину 2500 од/мл
0Л-71	прототроф,	продуцент олеандоміцину 3200 од/мл

Одержання, злиття і регенерацію протопластів стрептоміцетів, а також їх трансформацію проводили за відповідними методиками (Шевченко и др., 1984; Okanishi et al., 1974; Dagert, 1979; Horwood et al., 1985).

Статистичний аналіз успадкування генетичних маркерів батьківських штамів нащадками (сегрегантами) гетероклонів проводили за загальноприйнятою методикою (Horwood, Sermonti, 1962).

Генетичний аналіз нащадків із злиття протопластів проводили двома методами: неселективним і селективним аналізом спор колоній регенерантів, що вирости на повноцінному середовищі. Селективний аналіз гаплоїдних рекомбінантів здійснювали за методикою, розробленою Хопвудом (Horwood., 1959).

Дослідження речовин з антибіотичними властивостями проводили методами аналітичної та препаративної тонкошарової хроматографії (Шаршунова и др., 1980). Біоавтографію отриманих тонкошарових хроматограм проводили за методом (Aszalos et al., 1968).

### **1. Генетичний аналіз гаплоїдних рекомбінантів.**

Метод злиття протопластів має цінні переваги в порівнянні з класичними способами генетичного обміну у прокариот. Використання цього методу дозволяє збільшити частоту рекомбінації на кілька порядків, що особливо важливо при міжвидовій гібридизації. При злитті протопластів взаємодіють повні геноми батьківських штамів. Також важливим є те, що обмін при злитті протопластів не залежить від наявності фертильних плазмід.

Генетичний аналіз колоній регенерантів на стабільність успадкування ознак батьківських штамів показав наявність трьох

типів нащадків: нестабільних диплоїдів (гетероклонів), стабільних гаплоїдних рекомбінантів і одного із батьківських типів.

Нами було проведено ряд п'яти- і чотирьох факторних схрещувань. Аналіз одержаного потомства проводили за допомогою як селективного, так і неселективного аналізу.

Генетичний аналіз регенерантів із п'ятифакторного злиття протопластів 7 *nic1 met1 thr1 X 112 ilv1 his1* проводили за допомогою неселективного методу (табл. N2). Використання для аналізу трьох критеріїв - градієнту частот алелей і мінімуму множинних кросинговерів, а також адитивності відстаней на генетичній карті - дало можливість встановити порядок розташування генетичних маркерів визначено як: *thr1-met1-nic1-ilv1-his1* (мал.1).

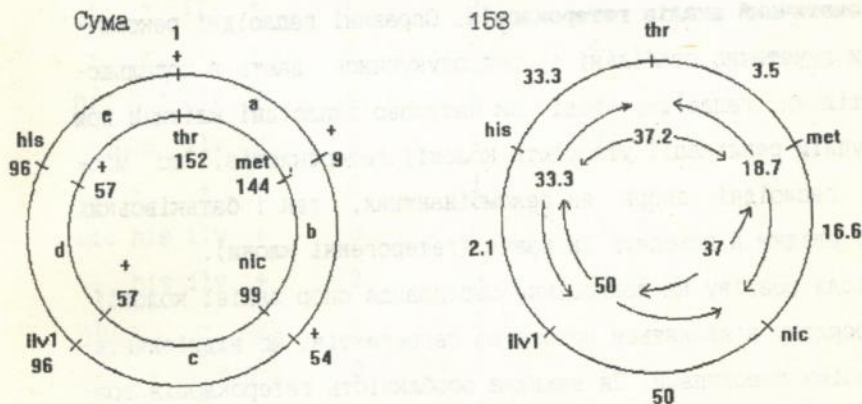
Генетичний аналіз регенерантів із чотирьохфакторного злиття протопластів 47-10 *nic1 his1 X 42 thr1 tet1* проводили неселективним методом. Використання для аналізу трьох критеріїв - градієнту частот алелей і мінімуму множинних кросинговерів, а також адитивності відстаней на генетичній карті - дало можливість встановити порядок розташування генетичних локусів: *thr1-nic1-his1-tet1*.

Генетичний аналіз регенерантів із чотирьохфакторного злиття протопластів 42 *thr1 tet1 X 31 met1 ole1* проводили неселективним методом. Згідно вищенаведених критеріїв встановлено такий порядок розташування маркерів в даному злитті протопластів: *thr1-met1-tet1-ole1*.

Генетичний аналіз регенерантів із чотирьохфакторного злиття протопластів 32 *ilv2 pro1 X 47-146 nic1 his1* проводили неселективним методом. Генетичні маркери розташовані такому порядку: *ilv2-pro1-nic1-his1*.

Таблиця №2. Неселективний аналіз регенерантів із злигтя протопластів 7 nic1 met1 thr1 x 112 ilv1 his1

Генотипи	Кількість рекомбінантів	Кросинговер в районі (Мал.№1)
nic met thr ilv his	90	c, e
+ met thr ilv his	3	b, e
nic met thr + +	5	-
+ met thr ilv +	3	b, d
nic met thr + his	3	d, e
+ met thr + +	39	b, c
+ met + + +	1	a, b, c, e
+ + thr + +	8	a, c
nic + thr + +	1	a, b



Мал.1. Розташування генетичних локусів на кільцевій карті геному і відстані між ними в одиницях рекомбінації (дані із табл.2).

Генетичний аналіз регенерантів із чотирьохфакторного злиття протопластів 47-146 *nic1 his1 x 31-25 met1 pur1* проводили несе-  
лективним методом. Порядок розташування генетичних маркерів в  
даному злитті встановлено як: *his1-pur1-met1-nic1*

Неселективний аналіз регенерантів із чотирьохфакторного  
злиття протопластів 31-31 *met1 thr1 X 513 leu1 pdx1* показав  
такий порядок розташування генетичних маркерів:  
*thr1-met1-leu1-pdx1*.

Аналіз колоній із 5-факторного злиття протопластів штамів  
7*nic1 met1 thr1 X 32 ilv2 pro1* проводили з допомогою селектив-  
ного методу. Селективними маркерами в даному аналізі були  
(*nic+ pro+*). В результаті селективного аналізу на основі двох  
критеріїв: градієнту частоти алелей і мінімуму множинних кро-  
синговерів було встановлено такий порядок розташування цих  
маркерів: *nic1-pro1-ilv2-thr1-met1*.

**2. Генетичний аналіз гетероклонів.** Справжні гаплоїдні рекомбі-  
нанти генетично стабільні і, репродукуючись, дають в подальшо-  
му тільки гаплоїди, тоді як частково диплоїдні клітини при  
наступній реплікації утворюють колонії гетероклонів, що міс-  
тять гаплоїдні спори як рекомбінантних, так і батьківських  
форм, звідки й походить їх назва (гетерогенні клони).

Після розсіву на повноцінне середовище спор однієї колонії  
гетероклону з'являється потомство сегрегантів, що відрізняєть-  
ся своїми генотипами. Ця важлива особливість гетероклонів доз-  
воляє вести прямий підрахунок частот рекомбінації генів.

Характерною особливістю майже кожного гетероклону у всіх  
злиттях протопластів є порушення рівності частот комплементар-  
них генотипів, як це спостерігалось раніше в лабораторії Хоп-

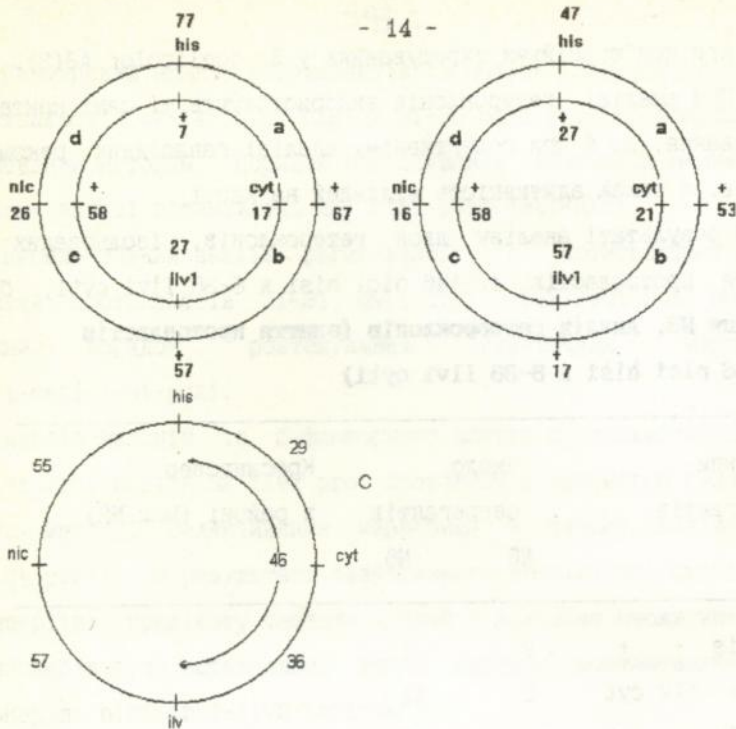
вуда при кон'югаційних схрещуваннях у *S. coelicolor* A3(2).

При аналізі гетероклонів використовують ті самі критерії картування, що й при селективному аналізі гаплоїдних рекомбінантів, а також адитивність віддалей на карті.

В результаті аналізу двох гетероклонів, ізольованих із алиття протопластів 47-146 *nic1 his1* x 8-36 *ilv1 cyt1*, були

**Таблиця N3. Аналіз гетероклонів (алиття протопластів 47-146 *nic1 his1* x 8-36 *ilv1 cyt1*)**

Генотипи сегрегантів	Число сегрегантів		Кросинговер в районі (Мал. N2)
	N5	N6	
<i>nic his + +</i>	9	1	-
<i>+ + ilv cyt</i>	0	11	
<i>nic his + cyt</i>	1	0	a, b
<i>+ + ilv +</i>	2	8	
<i>+ + + +</i>	5	5	a, c
<i>nic his ilv cyt</i>	13	6	
<i>+ his ilv cyt</i>	0	1	a, d
<i>nic + + +</i>	0	1	
<i>nic his ilv +</i>	3	6	b, c
<i>+ his ilv +</i>	9	24	b, d
<i>nic + + cyt</i>	0	1	
<i>nic + ilv cyt</i>	0	1	c, d
<i>+ his + +</i>	39	8	
<i>+ his + cyt</i>	3	1	a, b, c, d
Сума	84	74	



Мал.2. Градієнти частот хромосомних алелей в сегрегантах гетероклонів N5 і N6 і відстані між ними в одиницях рекомбінації із злиття протопластів 47-146 nic1 his1 x 8-36 ilv1 cyt1 (дані із табл.3.)

визначені частоти (табл. N3) рекомбінації між локусами his1-cyt1 (29%) та ilv1 і cyt1 (36%), а також між his1-ilv1 (46%) (мал. N2) .

Результати аналізу трьох гетероклонів, ізольованих із злиття протопластів 45-141 ilv2 pro1 x 47-146 nic1 his1, Дали можливість вирахувати частоти рекомбінації між локусами his1 і ilv2 (28%) та ilv2 і pro1 (22%), а також nic1-pro1 (58%) і між his1-pro1 (39%).

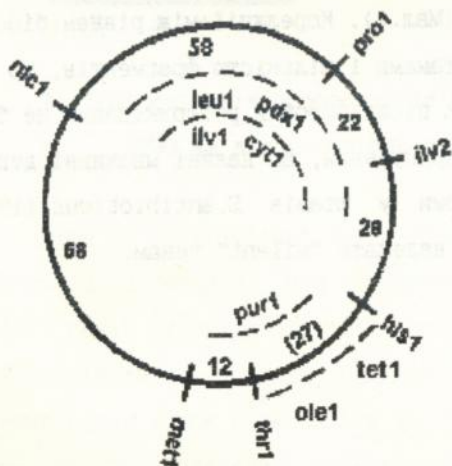
Із аналізу гетероклону, ізольованого із злиття протопластів 47-146 nic1 his1 x 31-25 met1 pur1 були встановлені частоти

ти рекомбінації і зчеплення між локусами *his1* і *pur1* (19%) та *pur1* і *met1* (18%).

Результати аналізу гетероклонів, ізолюваних із злиття протопластів 47-146 *met1 thr1* x 8-36 *nic1 leu1*, дали можливість визначити частоти рекомбінації між локусами *met1* і *thr1* (12%) і *nic1-leu1* (46%).

Із аналізу гетероклону, ізолюваного із злиття протопластів 7 *nic1 met1 thr1* x 32 *ilv2 pro1* були встановлені частоти рекомбінації і зчеплення між локусами *pro1-ilv2* (32%) та *thr1-met1* (10%), а також між *thr1-ilv2* (3%), *nic1-met1* (57%).

Дані одержані в результаті аналізу гетероклонів підтвердили порядок локусів на генетичній карті хромосоми, встановлений раніше за допомогою аналізу гаплоїдних рекомбінантів, а також дали можливість визначити віддалі між генетичними маркерами в одиницях рекомбінації і оцінити загальну довжину карти хромосоми, яка складає 215 одиниць рекомбінації (Мал.3)



Мал.3.

Генетична карта хромосоми *Streptomyces antibioticus* продуцента олеандоміцину. Віддалі між хромосомними алелями дані в одиницях рекомбінації. Точна локалізація маркерів на заштрихованих ділянках невідома.

### 3. Рестрикційний аналіз.

Для встановлення наявності носіїв позахромосомної спадковості у штамів *S. antibioticus* 11891, 1790, 32-280, ОЛ-1, ОЛ-71, що мали різний ступінь антибіотичного синтезу, було проведено виділення плазмідної ДНК вище наведеними методами. В досліджуваних штамів *S. antibioticus* 11891, 1790, 32-280, ОЛ-1, ОЛ-71 позахромосомної ДНК ні одним із вищезгаданих методів нам не вдалося виявити. Як відомо досить часто позахромосомна ДНК зустрічається в клітинах *Streptomyces* в дуже низькою копійністю. Так, наприклад, встановлено, що екстрахромосомний елемент eSA1 присутній в кількості однієї копії на хромосому в автономному стані при наявності 150 копій інтегрованих в хромосому *S. antibioticus* 1607.

Проведений рестрикційний аналіз тотальних ДНК виділених зі штамів 11891, 1790, 32-280, ОЛ-1 і ОЛ-71 показав наявність 5 сайтів впізнання для ендонуклеази Pst I, 7 сайтів для - Bam HI і 16 сайтів для SalG I, (Мал.4). Кореляції між рівнем біосинтезу антибіотику даними штамми і кількістю фрагментів, що утворюються в тотальній ДНК після обробки рестриктазами не було виявлено. Нами зроблено припущення, що наявні множинні дуплікації фрагментів хромосоми у штамів *S. antibioticus* 11891, 1790, 32-280, ОЛ-1, ОЛ-71 належать "silent" генам.

Мал.4. Рестрикційний аналіз то-  
тальної ДНК штамів *S. antibioticus*,  
гідролізованої Sal GI

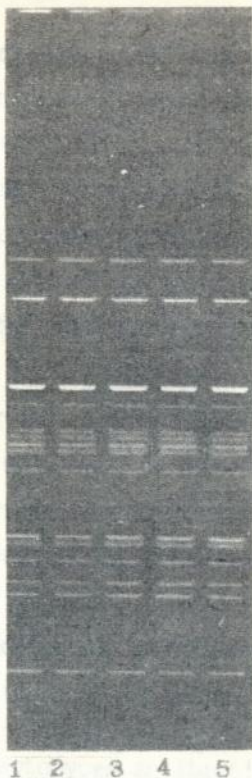
1-ДНК штаму 11891

2-ДНК штаму ЛС-ОЛ 1790

3-ДНК штаму 32-280

4-ДНК штаму ОЛ-1

5-ДНК штаму ОЛ-71



#### 4. Трансформація протопластів *S. antibioticus* ЛС-ОЛ 1790 за допомогою ДНК плазмиди pSG 1912.

Штам *S. antibioticus* ЛС-ОЛ 1790 є невисокоактивним проду-  
центом олеандоміцину. Він становить інтерес для вивчення екс-  
пресії генів плазмиди pSG 1912, що контролюють синтез антибіо-  
тика полікетидної природи (Полищук Л.В. и др., 1992). Оскільки  
олеандоміцин також відноситься до полікетидних антибіотиків,  
ідея роботи полягала в об'єднанні в одній клітині різних ге-  
нів, що мають відношення до біосинтезу полікетидів, взаємодія  
яких може привести до посилення синтезу відомих або до утво-  
рення нових антибіотичних речовин. Відбирали для дальшого дос-

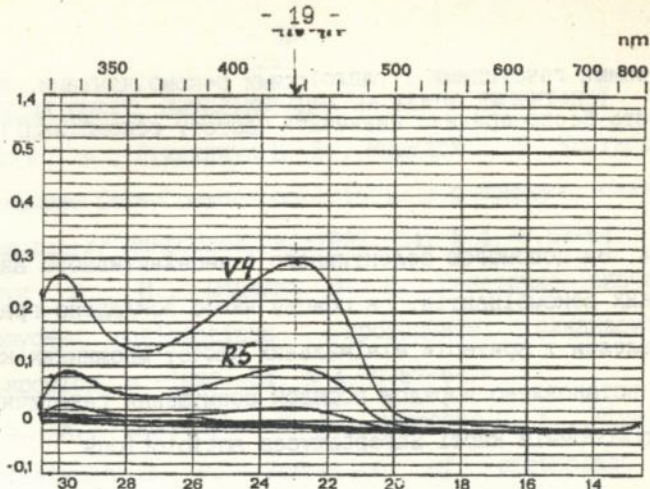
лідження ті з регенерантів, що відрізнялися інтенсивним темно-коричневим забарвленням і були оточені ореолом пігменту такого ж кольору. В контрольному досліді подібних колоній регенерантів не спостерігалось. Було відібрано для подальшого дослідження тридцять таких колоній. У відібраних трансформантів була виявлена плазмідна ДНК з аналогічною рухливістю. Досліди показали, що антибіотична активність трансформантів була набагато вищою від активності вихідного штаму ЛС-ОЛ 1790.

Проводилося дослідження хлороформ-ацетонових екстрактів *S. antibioticus* ЛС-ОЛ 1790 і трансформантів за допомогою ТШХ. Екстракцію антибіотику із агарових культур проводили сумішшю хлороформу і ацетону (2:1), в якій антибіотик добре розчиняється, наносили на пластинки Silufol UV 254 і висхідну хроматографію проводили в двох системах розчинників: хлороформ-ацетон (2:1) і бензол-етил-ацетат-ацетон-етанол (4:2:1:0,5). Було встановлено, що як в ЛС-ОЛ 1790 так і в трансформантів основний компонент екстрактів в обох системах розчинників має  $R_f=0,95$ . Антибіотичну активність хроматографічних пластинок проявляли методом біоавтографії. Досліди показали, що компонент з  $R_f=0,95$  має найбільшу антибіотичну активність. Ця речовина міняє свій колір в залежності від рН середовища.

Було проведено спектрофотометричне дослідження антибіотика з  $R_f=0,95$ . Як видно на мал.5. речовини мають три максимуми поглинання при 416, 333 і 211 нм, які не відрізняються між собою у препаратів реципієнта і трансформантів.

Із даних досліджень випливає висновок про позитивну регуляторну роль генів плазмиди pSG 1912, яка проявляється в підвищенні синтезу жовто-коричневого антибіотика трансформантами в порівнянні з вихідним реципієнтним штамом.

Поглинання



Мал. 5. Спектри поглинання антибіотичної речовини в  $R_f=0,95$  реципієнтного (R5) штаму і трансформанта (V4).

### ВИСНОВКИ.

1. Процес генетичної рекомбінації при злитті протопластів у *Streptomyces antibioticus*-продуцента олеандоміцину характеризується утворенням двох типів рекомбінантних структур: стабільних гаплоїдних рекомбінантів і нестабільних диплоїдів, що дають початок гетероклонам.

2. Висока частота і різноманітність комплементарних генотипів гаплоїдних рекомбінантів при неселективному аналізі рекомбінантного потомства свідчить про повноцінний внесок генетичного матеріалу обома батьками в склад зиготи, що дозволяє відбуватися кросинговерам в кожній ділянці хромосоми на протязі регенерації злитих протопластів.

3. Сегреганти гетероклонів представлені вихідними бать-

ківськими генотипами і гаплоїдними рекомбінантами, що дає можливість безпосередньо визначити частоту рекомбінації між генами.

4. За допомогою селективного і неселективного аналізу гаплоїдних рекомбінантів, в основу якого покладено градієнт частот алелів і критерії мінімальних частот множинних кросинговів, встановлено порядок розташування генетичних локусів на хромосомній карті *Streptomyces antibioticus*.

5. На основі аналізу гетероклонів підтверджено порядок генів, встановлений аналізом гаплоїдів, і визначено віддалі між усіма 13 генетичними локусами на карті хромосоми, загальна довжина якої складає 215 одиниць рекомбінації.

6. Рестрикційний аналіз тотальної ДНК п'яти штамів промислового продуценту олеандоміцину з різною антибіотичною активністю показав наявність однакових повторів, що містять 5 сайтів розривання для ендонуклеази PstI, 7 сайтів-для BamHI, 16 сайтів-для Sal GI, свідчить про генетичну спорідненість досліджуваних штамів і відсутність кореляції між кількістю сайтів рестрикції ендонуклеазами і антибіотичною активністю.

7. Показано здатність плазмиди pSG1912 значно підвищувати синтез антибіотичної речовини оранжевого кольору з  $R_f$  0,95 у трансформантів *S. antibioticus* LC-OL 1790, що може вказувати на регуляторну роль плазмиди в експресії генів синтезу антибіотиків у стрептоміцетів.

**СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Шевченко А. А., Лукьянчук В. В., Мацелюх В. В. Картирование хромосомы *Streptomyces antibioticus* с помощью слияния протопластов.// Микробиол. ж.-1992.-54.-N 4.-С.57-64.
2. Лук'яничук В. В., Мацелюх В. П. Генетичне вивчення *Streptomyces antibioticus*- продуцента олеандомицину.//Мікробіол. ж.-1996.-54.-N 4.-С.57-64.
3. Sedina S. A., Lukyanchuk V. V., Naumenko O. V., Kigel N. F., Matselyukh B. P. Formation of protoplast of lactic-acid and bifidus bacteria.// Микробиол. ж.-1996.-54.-N 4.-С.57-64.
4. Шевченко А. А. Лукьянчук В. В. Генетический анализ продуцента олеандомицина.//Тезисы докладов VII съезда украинского микробиологического общества. 1989.-ч.1.- С. 37.
5. Shevchenko A. A., Lukyanchuk V. V. Genetic analysis of the producer of oleandomycine.//Theses of the VII National conference of producing and using of antibiotics.-Bulgaria.- 1990.- p. 13.
6. Лукьянчук В. В.Шевченко А. А. Рестрикционный анализ хромосомной ДНК различных штаммов продуцента олеандомицина// Тезисы докладов VI Съезда УОГиС . Полтава, 1992.- С.126.
7. Лукьянчук В. В.Шевченко А. А. Рестрикционный анализ хромосомной ДНК продуцента олеандомицина//Тезисы докладов VI Съезда всесоюзного генетического общества. 1992.- С. 99.
8. Matselyukh B, Shevchenko A, Lukyanchuk V. Genetic map of *Streptomyces antibioticus*- producer of oleandomycin.//Theses of the 9th International Symposium of the Biology of Actinomycetes.-Moscow.-1994.-p.111.
9. Eresko G. A., Shevchenko A. A., Lukyanchuk V. V., Sedina

S. A., Naumenko O. V., Kigel N F. Properties lactic acid and bifidus bacteria variants, which were obtained after protoplast regeneration.//Theses of the 24 International Dairy Congress.- Australia.- 1994.- p. 87.

10. Плазмидный анализ стартовых культур лакто и бифидобактерий. // Тези доповідей Всеукраїнської науково-технічної з розробки та впровадження технологій в харчову та переробну промисловість. Київ.- 1995.- С. 167.

Lukyanchuk V. V.

**MAPPING OF CHROMOSOME OF *STREPTOMYCES ANTIBIOTICUS*-PRODUCER OF OLEANDOMYCIN USING FUSION OF PROTOPLASTS**

The Candidate Thesis for a Master's Degree, a Speciality 03.00.07 - Microbiology- Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996. The material of 10 scientific publication on results of genetic analysis of progeny of protoplasts fusion of auxotrophic, antibiotic inactive and antibiotic-resistant *Streptomyces antibioticus* mutants is defended. Genetic analysis of progeny was conducted by two methods: analysis of haploid recombinants and analysis of heteroclones. Arrangements of 13 loci and linkage between the corresponding pairs of markers were result of progeny analysis. These data served as a basis for construction of the preliminary map of oleandomycin producer genome.

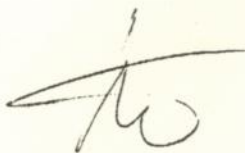
ЛУКЬЯНЧУК В. В.

**КАРТИРОВАНИЕ ХРОСОМЫ *STREPTOMYCES ANTIBIOTICUS* - ПРОДУЦЕНТА  
ОЛЕАНДОМИЦИНА С ПОМОЩЬЮ СЛИЯНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07. - микробиология, Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, 1996.

Защищаются 10 работ, которые содержат результаты генетического анализа потомства полученного при слиянии протопластов ауксотрофных, антибиотиконеактивных и антибиотико устойчивых мутантов *Streptomyces antibioticus*. Генетический анализ потомства проводился двумя методами- анализом гаплоидных рекомбинантов и анализом гетероклонов. В результате анализа потомства определен порядок расположения 13 локусов и установлено сцепление между соответствующими парами маркеров. Эти данные явились основанием для построения предварительной карты генома продуцента олеандомицина.

**Ключові слова:** стрептоміцети, протопласти, злиття протопластів, рестрикція, трансформація, трансформанти, антибіотик, тонкошарова хроматографія, стійкість до антибіотиків, антибіотична дія.



439,80

AB 35.662