

Клонування та структурний аналіз *peh*-гена *Klebsiella oxytoca* VN13

Г. В. Ковтунович, О. В. Лар, Н. О. Козировська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Визначено нуклеотидну послідовність промоторної області та 1450 п. н. структурної частини гена полігалактуронази (peh) ендоситної бактерії K. oxytoca VN13, який, можливо, бере участь у механізмі проникнення бактерій у тканини коренів рослин. Досліджено рівень гомології ДНК та амінокислотної послідовності кодованого білка з відповідними послідовностями інших бактерій.

Вступ. Полігалактуронідаза є ферментом, що розщеплює полігалактуронову кислоту — складову пектину — гідролітичним шляхом і таким чином може відігравати певну роль у проникненні ендоситних бактерій всередину тканин рослин. Фермент відомий як фактор вірулентності у фітопатогенних бактерій [1]. Гени, які кодуєть синтез ендосит- та екзополігалактуроназ, вивчено у бактерій, що спричиняють захворювання у рослин *Ralstonia solanacearum* [2—4], *Erwinia carotovora* [5—8], *E. chrysanthemi* [9], *Agrobacterium vitis* [10], *Burkholderia cepacia* [11]. Молекулярний аналіз взаємодії генів із сигнальними молекулами рослин показав, що полігалактуроназа необхідна на ранньому етапі інфекційного процесу [12]. Об'єкт даного дослідження *K. oxytoca* VN13 не є фітопатогеном. Співіснування в асоціації рослина—бактерія є взаємовигідним. Бактерії отримують унікальну екологічну нішу, складаючи конкуренцію фітопатогенним мікроорганізмам.

Вірогідно, що процес проникнення бактерій у внутрішні тканини рослин не переростає у фітопатогенний процес через особливості організації та реалізації генетичного матеріалу, що забезпечує відносно невисокі рівні експресії генів, які беруть участь у деструкції пектинів та, можливо, інших компонентів клітинної стінки рослин. У попередніх дослідженнях нами показано кореляцію між пектолітичною активністю та рівнем проникнення бак-

терії *K. oxytoca* VN13 всередину тканин рослини-хазяїна [13]. Метою даної роботи є ідентифікація та аналіз гена *K. oxytoca* VN13, відповідального за деполімеризацію пектину, для подальшого вивчення його можливого впливу на процес взаємодії бактерій з рослинами.

Матеріали і методи. Бактеріальні штами, які використовували в роботі, наведено в табл. 1. Для вирощування бактерій застосовували такі живильні середовища: амінопептид (Росія) та мінімальне середовище M9 [15]. Антибіотики ампіцилін, рифампіцин та канаміцин використовували в концентраціях 100, 50 та 50 мкг/мл відповідно, полігалактуронат натрію (як джерело вуглецю) — в концентрації 0,2 %. Гліцерин (0,2 %), дріжджовий екстракт (0,5 %) та тіамін (20 мг/л) додавали при необхідності до M9. В експериментах з трансформації бактерій застосовували рідке та агарове середовище LB [15].

Якісний тест на пектолітичну активність. Здатність бактерій до продукції ферментів деструкції пектину полігалактуронази та пектатліази, субстратом для яких є полігалактуронові кислота, визначали за здатністю колоній утворювати заглиблення на поверхні кальцій-стабілізованого поліпектатного гелю внаслідок руйнації полігалактуронові кислоти. Для отримання поліпектатних чашок за основу брали методику приготування SSA-чашок (semisolid agar) [16] з незначними модифікаціями. В нагріту майже до кипіння суміш: 0,5 % дріжджового екстракту, 0,3 % агар-агара, 0,12 % CaCl₂ із заздалегіть розчиненим агаром при

Таблиця 1
Бактеріальні штами і плазміди

Штами або плазміди	Фенотип або генотип	Джерело одержання
<i>K. oxytoca</i> VN13	R ^f	Колекція відділу
<i>E. carotovora</i> 8659	Дикий тип	Інститут мікробіології і вірусології НАН України
<i>E. coli</i> JM109	F' [<i>traD36 proAB lacI_Z-M15</i>] <i>endA1 gyrA96 recA1 hsdR17 supR17 supE44 thi relA1λ-Δ(lac-proAB)</i> Rf	Колекція відділу
<i>E. coli</i> DH5 α	F- <i>LacZDM15 endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA relA1λ-</i>	Колекція відділу
<i>pBluescript SK⁻</i>	Ap ^r	«Stratagene» (США)
<i>pUC28</i>	Ap ^r	Колекція відділу
<i>pK18</i>	Km ^r	Колекція відділу [14]
<i>pBluS2</i>	Ap ^r , <i>peh⁺</i>	Дана робота
<i>pKS2</i>	Km ^r , <i>peh⁺</i>	Дана робота
<i>pBluS2ΔH</i>	Делеція <i>HindIII</i> -фрагмента <i>pBluS2</i>	Дана робота
<i>pBluS2ΔR</i>	Делеція <i>EcoRI</i> -фрагмента <i>pBluS2</i>	Дана робота
<i>pKRS2</i>	<i>EcoRI</i> -фрагмент <i>pBluS2</i> в <i>pK18</i>	Дана робота
<i>pKPS2</i>	<i>PstI</i> -фрагмент розміром 2,4 тис. п. н. у <i>pBluS2</i>	Дана робота
<i>pKS2ΔP</i>	Делеція всіх <i>PstI</i> -фрагментів <i>pKS2</i>	Дана робота
<i>pUCMHS2</i>	<i>MluI-HindIII</i> -фрагмент <i>pBluS2</i> розміром 1,9 тис. п. н. у <i>pUC28</i>	Дана робота
<i>pKRMS2</i>	<i>EcoI-MluI</i> -фрагмент <i>pBluS2</i> в <i>pK18</i>	Дана робота

інтенсивному перемішуванні на магнітній мішалці з нагрівом поступово всипали полігалактуронат натрію до концентрації 3 % і доводили до кипіння. Стерилізували кип'ятінням протягом 2—3 хв. Після охолодження до температури 60—70 °С розливали в чашки Петрі. Інокуляцію бактерій на чашки здійснювали уколом. Інкубували чашки при температурі 37 °С протягом 24—40 год кришкою догори.

Кількісне визначення пектатліазної та полігалакторуназної активності. Пектатліазну (ПЛ) активність визначали за поглинанням ненасичених продуктів реакції при довжині хвилі 235 нм у реакційній суміші: 0,23 % поліпектата натрію, 0,1 М трис-НСl (рН 8,5), 0,3 мМ СаСl₂ [16]. За одиницю активності брали кількість пектатліази, що збільшувала оптичну густину реакційної суміші на 1,0 опт. од. при 235 нм за 1 хв при температурі 37 °С. Полігалакторуназу (ПГ) активність визначали як збільшення відновлювальної властивості реакційної суміші, що виникає при гідролітичному розщепленні полігалактуронової кислоти полігалакторуназою у зв'язку з вивільненням альдегідних груп галактуронової кислоти. Склад реакційної

суміші: 0,05 М NaAc (рН 5,2), 0,2 М NaCl, 0,5 % полігалакторунаата натрію [17]. Відновлювальні властивості суміші визначали за допомогою фериціанідного методу [18]. За одиницю активності брали таку кількість фермента, яка вивільняє 1 ммоль/л альдегідних груп при температурі 37 °С за 1 хв.

Геноінженерні методи. Хромосомну ДНК виділяли за методом Мармура [19]. Виділення плазмідної ДНК здійснювали методом лужного лізису [20]. При необхідності препарати ДНК обробляли РНКазою у концентрації 100 мкг/мл з наступним очищенням фенолом та хлороформом. Ферменти рестрикції *BamHI*, *SalI*, *HindIII*, *PstI*, *EcoRI*, *MluI*, *NoI* фірми «Fermentas» (Литва); *EcoRV*, *SacI*, *Sau3A* фірми «Pharmacia Biotech.» (Швеція), а також ДНК-лігазу фага T4, ДНК-полімерази і панкреатичну лужну фосфатазу фірми «Boehringer Mannheim» (ФРН) використовували за прописом фірми-виробника. Розчини X-gal та IPTG готували і використовували, як описано [20]. Маркери молекулярної маси ДНК готували, гідролізуючи ДНК фага λ рестриктазою *HindIII* та співгідролізом

*Hind*III, *Eco*RI. Концентрацію плазмідної ДНК визначали електрофорезом лінеаризованих рестриктазами плазмід в агарозному гелі у порівнянні з ДНК-стандартом. Рестрикційні фрагменти ДНК елюювали з легкоплавкої агарози [20]. Компетентні клітини *E. coli* довготермінового зберігання готували та здійснювали їхню трансформацію за методикою Нішімура з співавт. [21].

Первинну послідовність клонованої ДНК визначали методом Сенгера [22], використовуючи апарат ALF express™ та Cy5™ AutoCycle™ набір («Pharmacia Biotech», Швеція). Гомологію ДНК і поліпептидного продукту з відповідними послідовностями інших мікроорганізмів визначали за допомогою електронної служби Blast 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США за допомогою програм VblastN та BlastX.

Результати і обговорення. Клонування здатності до деполімеризації поліпектату бактерії *K. oxytoca* VN13 в *E. coli*. Експресія генів першої стадії деградації пектинів за допомогою пектатліаз та полігалактуроназ, субстратом для яких є полігалактуронова кислота (поліпектат) — продукт деметилювання природного пектину метилестеразою, призводить до занурення колоній на чашках з кальцій-стабілізованим поліпектатним гелем [16]. Цей метод був використаний для скринінгу бібліотеки генів дикого штаму *K. oxytoca* VN 13 в *E. coli*. Банк генів отримали на основі плазмідного вектора *pBluescript* SK⁻, в *Bam*HI-сайт якого клонували продукти неповного гідролізу хромосомної ДНК клесієли рестриктазою *Sau*3A. Для лігування були використані елюйовані фрагменти розміром від 2 до 9 тис. п. н. Лігазною сумішшю трансформували компетентні клітини *E. coli* JM109. Серед 4500 Ap^r клонів, що давали незабарвлені колонії на чашках з X-gal та IPTG, було відібрано один, який стабільно давав занурені колонії на поліпектатному гелі подібно до *K. oxytoca* VN13. Виділену з даного клону плазмиду гідролізували рестриктазою *Not*I для отримання її лінійної форми. Розмір одержаної плазмиди *pBluS2* становив близько 6,5 тис. п. н. З урахуванням величини вектора вставка була розміром 3,5—3,6 тис. п. н. Походження плазмиди підтверджувалося наявністю *Bgl*I-фрагмента величиною 1,2 тис. п. н., який знаходився у векторній частині плазмиди. При перетрансформації *E. coli* всі трансформанти *pBluS2* давали клони, що занурювалися на чашках з поліпектатним гелем. Цей факт вказує на наявність у клонованому фрагменті гена деградації поліпектату. Було встановлено, що присутність у живильному середовищі IPTG не впливає на інтенсивність занурення колоній, отже, транскрипція гена ініціюється з власного промото-

ра. З додаванням глюкози в живильне середовище експресія гена повністю припинялася — колонії не були здатними занурюватися на чашках з поліпектатним гелем. Таким чином, має місце факт катаболітної репресії даного гена.

Визначення активності ферментів деполімеризації поліпектату, які експресуються з клонованого фрагмента ДНК. Лізат нічної культури *E. coli* JM109 з плазмидою *pBluS2*, отриманий на ультразвуковому дезинтеграторі, перевіряли на наявність активностей ПЛ та ПГ — основних ферментів першої стадії деградації полігалактуронового ланцюга. Перша спроба не підтвердила наявності жодної з досліджуваних активностей. Однією з причин негативного результату міг бути низький природний рівень активностей цих ферментів у *K. oxytoca* VN13. Так, активність ПГ інколи була на межі чутливості методу. Крім того, нами був зафіксований факт нестабільного наслідування плазмиди *pBluS2* в *E. coli* JM109. Варто зазначити, що нічна культура *E. coli* JM109 з *pBluS2*, отримана з використанням рідкого середовища (LB з ампіциліном), містить не більше одного відсотка клітин з плазмидою, тобто здатних давати колонії на агаровому середовищі з ампіциліном. Цікаво, що з додаванням глюкози до живильного середовища плазмиди стабільно наслідувалася. Отже, продукт клонованого гена є в певній мірі токсичним для *E. coli*, і це надає селективної переваги тим клітинам, які втратили плазмиду. Селективний тиск на збереження плазмиди, що забезпечується наявністю в середовищі ампіциліну, швидко усувається завдяки дії β-лактамази, яка, як відомо, секретується в навколишнє середовище. Присутність глюкози призводить до репресії клонованого гена і, таким чином, нейтралізує основний фактор елімінації плазмиди. Для забезпечення більшої стабільності фрагмент було переклоновано по сайтах *Sac*I та *Sal*I у вектор *pK18*, що містить ген резистентності до канаміцину.

Новоутвореною плазмидою *pKS2* трансформували *K. oxytoca* VN13 та *E. coli* DH5α. Невідомо з яких причин, але рівень трансформації *E. coli* DH5α плазмидами *pBluS2* та *pKS2* був на порядок вищим, ніж *E. coli* JM109 при однаковому рівні компетентності. Тому надалі ми використовували штам *E. coli* DH5α. Культури *E. coli* та *K. oxytoca* з плазмидами *pK18* (контроль) та *pKS2* перевіряли на ПЛ та ПГ активність. Штам *K. oxytoca* з *pKS2* мав той же рівень ПЛ активності, що й дикий штам. В *E. coli* ця активність була відсутня в обох штаммах. Однак в *E. coli* (*pKS2*), на відміну від контролю, було зафіксовано ПГ активність на рівні *K. oxytoca* з цією ж плазмидою, що в п'ять разів

Таблиця 2
Активність полігалактуронази, $\text{мМ} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$

Штам	Загальна активність	Активність у супернанті
<i>E. coli</i> DH5 α (<i>pK18</i>)	0,0008	—
<i>E. coli</i> DH5 α (<i>pKS2</i>)	0,0164	0,00
<i>K. oxytoca</i> VN13 (<i>pK18</i>)	0,0031	—
<i>K. oxytoca</i> VN13 (<i>pKS2</i>)	0,0149	0,00

перевищувала активність контролю клесієли з плазмідною *pK18* (табл. 2).

Таким чином, було встановлено, що клонований фрагмент геномної ДНК *K. oxytoca* VN13 містить ген полігалактуронази (*reh*), який експресується з власного промотора.

Рестрикційний аналіз та встановлення орієнтовної локалізації *reh*-гена в межах клонованого фрагмента. У подальшій роботі з клонованою послідовністю для встановлення локалізації *reh*-гена та створення субклонів для дослідів з визначення нуклеотидної послідовності було побудовано рестрикційну карту клонованого фрагмента. Сайтів розпізнавання для рестриктаз *NotI*, *SacI*, *XbaI*, *SaI* *Bam*HI не було виявлено. Встановлено наявність

сайтів розпізнавання для рестриктаз *PstI* (три сайти), *EcoRI* та *HindIII* (по одному) (рис. 1). Для знаходження локалізації гена в межах клонованого фрагмента було створено такі конструкції: 1) *pBluS2ΔH* — делеція *HindIII*-фрагмента *pBluS2*; 2) *pBluS2ΔR* — делеція *EcoRI*-фрагмента *pBluS2*; 3) клоновано *EcoRI*-фрагмент *pBluS2* в плазміді *pK18* з утворенням плазмід *pKS2R1* (рис. 1). Штам *E. coli* з плазмідною *pBluS2ΔH* зберігав *Peh*⁺-фенотип. Плазмід *pBluS2ΔR* та *pKRS2* не надавали колоніям *E. coli* властивості занурюватися на чашках з поліпектатним гелем. Це вказує на той факт, що *EcoRI*-сайт знаходиться в межах *reh*-гена.

Визначення та аналіз нуклеотидної послідовності *reh*-гена здійснювали з використанням плазмід *pBluS2ΔR*, *pKRS2*. Для уточнення послідовності були створені плазмід *pKPS2*, *pKS2ΔP* (рис. 1). На 3'-кінці даної послідовності було знайдено сайт розпізнавання для рестриктази *MluI*, що дало змогу додатково створити плазмід *pUCMHS2* та *pKRMS2* і продовжити визначення послідовності у напрямку 3'-кінця *reh*-гена.

Аналіз нуклеотидної послідовності та кодового нею поліпептиду. Довжина визначеної послідовності клонованого фрагмента ДНК складає 1690 п. н. (рис. 2). В її межах знайдено частину відкритої рамки зчитування довжиною 1450 п. н., яка обривається на 3'-кінці поданої на рисунку послідовності ДНК. За шість нуклеотидів до ініціюючого кодона знаходиться сайт зв'язування з рибосомою — **TAAGGA**. Амінокислотна послідовність (рис. 2) має високий рівень гомології з послідовностями широкого спектра мікроорганізмів (табл. 3). Це підтверджує наведені вище дані біохімічних тестів стосовно того, що клонований нами ген кодує саме ПГ, а не ПЛ. З табл. 3 можна також зробити попередній висновок щодо екзосубстратної специфічності даної ПГ. Найвищий рівень гомології спостерігається саме в порівнянні з екзополігалак-

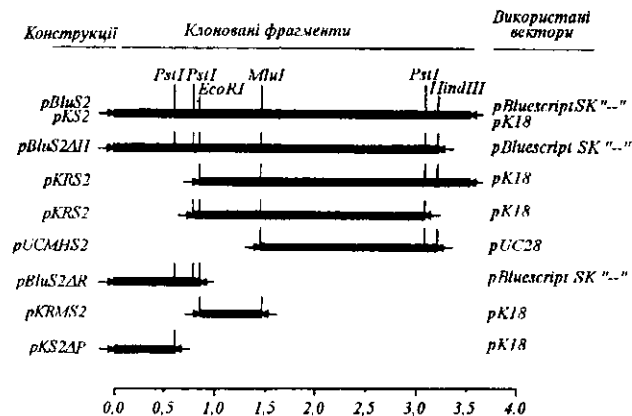


Рис. 1. Рестрикційна карта клонованого фрагмента геномної ДНК *K. oxytoca* VN13 з *reh*-геном та отриманих субклонів

1 gatcggggtttgcccatatcgtaccgacttcgtgaggctatcgtatcgatgattctcagc
 61 agtagaaggaagctggcggtgaggtccgcctttgcttatctgattaagtttttttc
 121 cctgatgaaagattgaaactgactcggctttatccccacataaatataaaatgatgtt
 181 ttttttaaatgaatttgaattttttttctcataaaatgatgacatt**agg**aaaatctatg
 241 cgcaataccttcagacctgcacggcgatgctggcggttggcaatcgactagccgggctc
 301 qcaggcggctgtaatgacagcggcggaaccgtcgataaccagcagatgcgccgcctcc
 361 gcgccacaaaatgctcatggttccgatactgctcggatgaaaacagcctggtgctggtc
 421 tgggaaaaaccggagtctgagaccgagcaggtggtggactacccgctctatcgtcaaggc
 481 gagcggctgggctggcgctgaaaatcaaaaccatttttccccggcaaaccttatatt
 541 gataactctatcagcggatcgccagcagcggctggcagcagaaaatcgatctgcccagc
 601 ttcacggccaaccaacctgcagccggatacggagtatgcctttacgggtgcccggctctac
 661 gccaatggccaggaatctccggacagcggctggttaagcgcaaacccgcaaacggccg
 721 cacgtcatcgaagccagcaattcggcgcggaagggtagcggcaccacgctgaataccag
 781 gcgctgcagcgggcatgtagctgtaccgtcacgcactatcctcagggctgcaaggtg
 841 ctgatttccggcgcggaattcaaaactggcgcttggcttctgcacagcagatgaccctg
 901 gatattgcggctggcgccaccctgctgggttcggacgatccggcccagatccgcttgat
 961 aaaggctattacctctatccctatagcagatcatccgcagcctcgccgccgcatcatta
 1081 attaacgtgctgggcgcggaagcagataagggcgagtctccggccggaaacgtttcgtaatt
 1141 cgcacgttgggaaagccagcagattgacggcaacggctggaccggcgctcaaaagcggc
 1201 gccaaaaaagtcggcgcggaagcggatttctggcaaacatcagaccgaagcggctatcgcg
 1261 gaagggtattgaaaacaatagccctataaaaaccggcctccagcctgatgacctgccc
 1321 ggcgtgcaaaatctctaccttgcgggactgactattcgtaatcccgctttccacggggtg
 1381 atggtgctggaggttagaaaatattaccctgaatgggcttgtgcacagacctttgacggc
 1441 aataacggcagcggcgtcgagttcggcaatagcaaaaacggcttggcttcaataacttc
 1501 tttgataccggagatgattgcgttaattttgccgcggggttggtaaaggcggcaaacg
 1561 tttctcagcagccgcaaacggcgcggtgatttttaataactatttccgtaaggccac
 1621 ggcggcgtggtgacgggtagccataccggcgcggtggatcgaaaacgttcgcccgggat
 1681 aacgtcatgt

Рис. 2. Послідовність ДНК промоторної області та більшої частини клонованого *peh*-гена. Жирним шрифтом показано сайт зв'язування з рибосомою та ініціюючий кодон. Послідовність структурної частини гена підкреслена

	5	10	15	20	25	30
1	M R N T F R P A R G M L A L A I A L A G L A G G C N D S G G					
31	T V D N Q H D A P A S A P Q N V M V P I L S A D E N S L V L					
61	V W E K P E S E T E Q V V D Y A V Y R Q G E R L G L A R E N					
91	Q N H F S P A K P Y I D N F Y Q R I A S D G W Q Q K I D L R					
121	S F T A T N L O P D T E Y A F T V R A V Y A N G Q E S P D S					
151	A V V K A Q T R K T P H V I E A S T F G A K G D G T T L N T					
181	Q A L Q R A I D S C T V T H Y P Q G C K V L I S G G E F K T					
211	G A L F L H S D M T L D I A A G A T L L G S D D P A Q Y P L					
241	D K G Y Y L Y P Y S D H P Q P R R P P S L I N V L G A D D K					
271	G E S P A G T F R N I R I V G K G T I D G N G W T R G V K S					
301	G G D A T I S D E L G N A L P Q Y R A S N A K K V G A D G I					
331	L A K H Q T E A A I A E G I E N N S A Y K N R R S S L M T L					
361	R G V Q N L Y L A G L T I R N P A F H G V M V L E L E N I T					
391	L N G L V H Q T F D G N N A D G V E F G N S K N A L V F N N					
421	F F D T G D D C V N F A A G F G K G A K T F H Q Q P Q S A A					
451	W I F N N Y F R K G H G A V V T G S H T G A W I E N V R A E					
481	D N V M					

Рис. 3. Амінокислотна послідовність (неповна) препротейна полігалакторунази, визначена за нуклеотидною послідовністю. Жирним шрифтом показано характерні для N-кінця лідерного пептиду амінокислотні залишки, що несуть позитивний заряд. Підкреслено амінокислоти, які формують гідрофобне ядро лідерного пептиду

туроназами (екзо-ПГ) таких мікроорганізмів, як *Y. enterocolitica* [23], *E. chrysanthemi* [24] та *R. solanacearum* [25]. Їхні амінокислотні послідовності мають гомологію з поліпептидом клонованого гена майже по всій довжині, за виключенням лідерного

пептиду, і є ідентичними відповідно на 56, 53 та 52 %. З урахуванням функціональної подібності амінокислот гомологія складає відповідно 71, 67 та 63 %. З іншого боку, ця послідовність проявляє значно нижчий рівень гомології з ендополігалак-

Таблиця 3
Подібність амінокислотної послідовності клонованого гена до відповідних білків інших бактерій

Мікроорганізм	Фермент	Величина гомологічної послідовності амінокислот, амінокислотні залишки	Ідентичність, %	Подібність з урахуванням відповідності амінокислот, %
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Екзополігалактуроназа	442	56	71
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Екзополі-альфа-D-галактуронозідаза	446	53	67
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Екзополігалактуроназа	444	52	63
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	Полігалактуроназа	451	38	52
<i>Agrobacterium vitis</i>	Ендополігалактуроназа	313	27	37
<i>Thermotoga maritima</i>	Екзополі-альфа-D-галактуронозідаза	315	26	42
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Полігалактуроназа	333	25	37
<i>Erwinia carotovora</i>	Ендополігалактуроназа	312	25	40
<i>Prevotella ruminicola</i>	Полігалактуроназа	126	34	49
<i>Kluyveromyces marxianum</i>	Ендополігалактуроназа	206	25	38

Примітка. Рівень гомології визначали, використовуючи електронну службу *Blast* (NCBI). Використана комп'ютерна програма *blastx* порівнює потенційні поліпептиди всіх можливих рамок зчитування з амінокислотними послідовностями банку відомих поліпептидів.

туроназами (ендо-ПГ). Так, ідентичність з ендо-ПГ *E. carotovora* [7] складає всього 25 % протягом фрагмента довжиною 312 амінокислотних залишків. Цікаво, що ендо-ПГ *Y. enterocolitica* та *E. chrysanthemi* мають подібний рівень гомології з цим білком.

Як відомо з літератури [7, 23, 24, 26], більшість ПГ з різних мікроорганізмів є секреторними білками і мають на N-кінці первинного транслянта сигнальний пептид, який є необхідним для транспорту через внутрішню мембрану в периплазматичний простір. Не є виключенням і білок клонованого нами гена. На N-кінці даного білка знаходиться послідовність, яка не проявляє гомології з проаналізованими білками, проте має структуру, характерну для сигнального пептиду [27, 28]. Початок послідовності містить чотири амінокислотних залишки, що несуть позитивний заряд: три — аргініну та один — аспарагіну (рис. 3). Наступним є ланцюг з 16 амінокислотних залишків, що формують гідрофобне ядро. Послідовність також має кілька потенційних сайтів процесингу. Уточнити розташування сайта процесингу можна буде секвенуванням N-кінцевої частини зрілого білка.

Частина роботи виконано за рахунок коштів гранту UKR-038-96 (German Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie) та гранту Міннауки України 5.04/0141.

Г. В. Ковтунович, Е. В. Лар, Н. А. Козыровская

Клонирование и структурный анализ *peh*-гена *Klebsiella oxytoca* VN13

Резюме

Определена нуклеотидная последовательность промоторной области и 1450 п. н. структурной части гена полигалактуроназы (*peh*) эндофитной бактерии *K. oxytoca* VN13, который, возможно, принимает участие в механизме проникновения бактерий в ткани корней растений. Исследован уровень гомологии ДНК и аминокислотной последовательности кодированного белка с соответствующими последовательностями других бактерий.

G. V. Kovtunovich, O. V. Lar, N. O. Kozyrovska

Cloning and structural analysis of the *Klebsiella oxytoca* VN13 *peh* gene

Summary

The nucleotide sequence of the promotor part and 1450 bp of the structural part of the endophytic bacterium *Klebsiella oxytoca* VN13 *peh* gene which probably takes part in the penetration of bacteria into the plant root tissue has been determined. The levels of homology of both DNA and amino acid sequences of the protein coded and appropriate sequences of different bacteria have been analysed. Cloning and structure analyse of *Klebsiella oxytoca* VN13 *peh* gene

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Colmer A., Keen N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis // Annu. Rev. Phytopathol.—1986.—24.—P. 383—409.

2. Roberts D. P., Denny T. P., Schell M. A. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity // J. Bacteriol.—1988.—170.—P. 1445—1451.
3. Schell M. A., Roberts D. P., Denny T. P. Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity // J. Bacteriol.—1988.—170.—P. 4501—4508.
4. Huang J. H., Schell M. A. DNA sequence analysis of *pglA* and mechanism of export of its polygalacturonase product from *Pseudomonas solanacearum* // J. Bacteriol.—1990.—171.—P. 3879—3887.
5. Hinton J. C., Gill D. R., Lalo D., Plastow G. S., Salmond G. P. Sequence of the *peh* gene of *Erwinia carotovora*: homology between *Erwinia* and plant enzymes // Mol. Microbiol.—1990.—4.—P. 1029—1036.
6. Saarilahti H. T., Heino P., Pakkanen R., Kaikinen N., Palva I., Palva E. T. Structural analysis of the *pehA* gene and characterization of its protein product, endopolygalacturonase, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Mol. Microbiol.—1990.—4.—P. 1037—1044.
7. Lei S. P., Lin H. C., Wang S. S., Higaki P., Wilcox G. Characterization of the *Erwinia carotovora* *peh* gene and its product polygalacturonase // Gene.—1992.—117.—P. 119—124.
8. Liu Y., Chatterjee A., Chatterjee A. K. Nucleotide sequence and expression of a novel pectate lyase gene (*pel-3*) and a closely linked endopolygalacturonase gene (*peh-1*) of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71 // Appl. Environ. Microbiol.—1994.—60.—P. 2545—2552.
9. Brooks A. D., He S. Y., Gold S., Keen N. T., Collmer A., Hutcheson S. W. Molecular cloning of the structural gene for exopolygalacturonate lyase from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzyme product // J. Bacteriol.—1990.—172.—P. 6950—6958.
10. Herlache T. C., Hotchkiss A. T., Jr., Burr T. J., Collmer A. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* // Appl. Environ. Microbiol.—1997.—63.—P. 338—346.
11. Gonzalez C. F., Pettit E. A., Valadez V. A., Provin E. M. Mobilization, cloning, and sequence determination of a plasmid-encoded polygalacturonase from a phytopathogenic *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* // Mol. Plant Microbe Interact.—1997.—10.—P. 840—851.
12. Flego D., Pirhonen M., Saarilahti H. T., Palva I., Palva E. T. Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora* // Mol. Microbiol.—1997.—25.—P. 831—838.
13. Kovtunovych G., Kordyum V., Kleiner D., Kozyrovska N. Enhancing the internal plant colonization rate with endophytic nitrogen-fixing bacteria // Biopolymeri i kletka.—1999.—15.—P. 300—306.
14. Pridmore R. D. New and versatile cloning vector with kanamycin-resistance marker // Gene.—1987.—56.—P. 309—312.
15. Miller J. H. Experiments in molecular genetics.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1972.—P. 431.
16. Starr M. P., Chatterjee A. K., Starr P. B., Buchanan G. E. Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures // J. Clin. Microbiol.—1977.—6.—P. 379—386.
17. Nasuno S., Starr M. P. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora* // J. Chemistry.—1990.—41.—P. 5298—5306.
18. Методи изучения и свойства целлюлитических ферментов // Под ред. С. Д. Варфоломеева.—М., 1990.—С. 138—140. (Итоги науки и техники; Биотехнология; Т. 25).
19. Marmur J. A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol.—1961.—13.—P. 208—218.
20. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
21. Nishimura A., Morita M., Sugino Y. A. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 6169.
22. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74.—P. 5463—5467.
23. Liao C.-H., Revear L., Hotchkiss A., Savary B. Genetic and biochemical characterization of an exopolygalacturonase and a pectate lyase from *Yersinia enterocolitica* // Can. J. Microbiol.—1999.—45.—P. 396—403.
24. He S. Y., Collmer A. Molecular cloning, nucleotide sequence, and marker exchange mutagenesis of the *exo-poly- α -D-galacturonosidase-encoding *peh-X* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 // J. Bacteriol.—1990.—172.—P. 4988—4995.*
25. Huang Q., Allen C. An *exo-poly- α -D-galacturonosidase*, *PehB*, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum* // J. Bacteriol.—1997.—179.—P. 7369—7378.
26. Chatterjee A. K., Buchanan G. E., Behrens M. K., Starr M. P. Synthesis and excretion of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species // Can. J. Microbiol.—1997.—25.—P. 94—102.
27. Oliver D. Protein secretion in *Escherichia coli* // Annu. Rev. Microbiol.—1985.—39.—P. 615—648.
28. Heijne G. Signal sequences the limits of variation // J. Mol. Biol.—1985.—184.—P. 99—105.

УДК 577.113.5

Надійшла до редакції 02.06.99