

Клонування і аналіз гена пектатліази *pelX* *Klebsiella oxytoca* VN13

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

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

Клоновано ген пектатліази pelX K. oxytoca VN13 та визначено його нуклеотидну послідовність. Проведено порівняльний аналіз гомології кодованого ним поліпептиду з відповідними білками інших бактерій. Визначено потенційну промоторну ділянку нуклеотидної послідовності. Наявність двох операторів для KdgR-репресора в межах промоторної області свідчить про індукцибельність згаданого оперону. Показано наявність сигнальної послідовності на N-кінці первинного транслята даного ферменту.

Вступ. *K. oxytoca* відома як азотфіксуюча бактерія, що виділяється з ризосфери [1, 2], а також ендоризосфери рису [3] та батату [4]. Раніше нами виявлено високу конкурентоспроможність бактерій *K. oxytoca* VN13 у ризосфері рослин, яка пов'язується з їхньою здатністю локалізуватися у внутрішніх тканинах коренів [3, 5, 6]. Обробка насіння пшениці суспензією цих бактерій стимулює ріст паростка на ранньому етапі розвитку та підвищує продуктивність рослини [7]. Досі невідомими є вплив на рослину ендofітної популяції бактерій, фактори, що сприяють проникненню бактерій в корені рослини, та механізми, які контролюють їхню чисельність у внутрішніх органах. Досить вірогідним виглядає припущення, що бактерії використовують тканини рослини як депо для реколонізації в разі загибелі зовнішньої популяції при несприятливих умовах.

Відомо, що пектолітичні ферменти, в першу чергу пектатліази та полігалактуронази, є головними факторами патогенності таких фітопатогенних бактерій, як *Erwinia chrysanthemi* та *E. carotovora*, внаслідок здатності до деполімеризації пектину клітинної стінки рослини [8]. У *K. oxytoca* виявлено два типи пектиназ: пектатліазу та полігалактуроназу [9, 10]. Перша деполімеризує деметильований пектин, утворюючи ненасичені олігогалактуро-

ніди, друга руйнує полімер гідролітичним шляхом [8]. Для вивчення ролі пектатліазної активності *K. oxytoca* в колонізації рослин нами попередньо клоновано ген полігалактуронази (*pehX*) *K. oxytoca* VN13 [11]. Створення інсерційного мутанта *K. oxytoca* VN13 з повністю неактивним *pehX*-геном та перевірка його колонізуючої здатності продемонстрували, що відсутність функціонально активного продукту клонованого гена не впливає на ефективність колонізації [12]. Цей висновок не заперечує повністю припущення щодо можливої участі пектолітичних ферментів у процесі взаємодії *K. oxytoca* VN13 з рослинами, тому наступним етапом роботи стало клонування гена пектатліази *K. oxytoca* VN13.

Матеріали і методи. Бактеріальні штами та плазмиди. В роботі використано штам *Escherichia coli* JM109 [*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, (FB, *traD36*, *proAB*, *lacI^oZDM15*] та *K. oxytoca* VN13 (Rf^R) з лабораторної колекції. Використано також плазмиди *pUC19* (Ap^R), *pUC28* (Ap^R) та *pBluescript(-)* (Ap^R) з колекції лабораторії.

Бактеріальні середовища та умови вирощування. Для вирощування бактерій використовували амінопептид (С. Петербург, РФ) та мінімальне середовище M9 [13]. При необхідності до M9 додавали гліцерин (0,2 %) та тіамін (6 мг/л). Антибіотики ампіцилін (Ap) та рифампіцин (Rf) використовували в концентрації 100 мкг/мл. *E. coli*

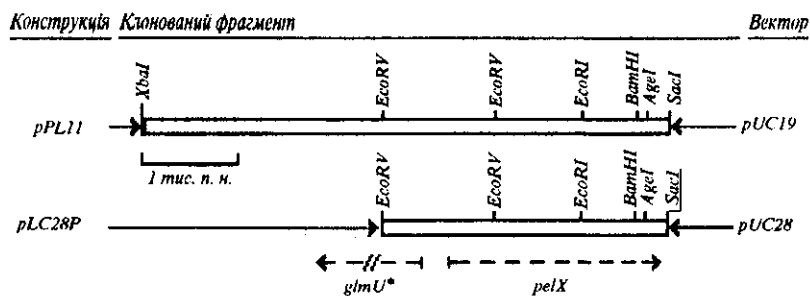


Рис. 1. Рестрикційна карта двох плазмід, які несуть *pelX* ген *K. oxytoca* VN13. Штриховими лініями зі стрілками вказано розташування і напрямок транскрипції *pelX* та суміжного гена в межах клонованого фрагмента; *glmU** — невідома відкрита рамка зачитування (ВРЗ), що кодує поліпептид, який має 86 %-ву гомологію з GlnU білком *E. coli*

JM109 та *K. oxytoca* VN13 вирощували при температурах 37 та 30 °C відповідно. Пектатне середовище для детекції пектолітичної активності (Pec-SSA) готували на основі напіврідкого агару [14] з невеликими модифікаціями. В нагріту майже до кипіння суміш 0,5 % дріжджового екстракту, 0,3 % агар-агару, 0,12 % CaCl₂ при інтенсивному перемішуванні поступово всипали полігалактуронат натрію (ПГН) до концентрації 3 % та доводили до кипіння. Стерилізували кип'ятінням протягом 2—3 хв. Після 24—36 год інкубації позитивні клони утворюють заглиблення в поліпектатному гелі.

Біохімічне визначення пектатліазної активності. Загальну пектатліазну активність вимірювали в ультразвукових лізатах нічних культур бактерій, використовуючи методику, описану в [10, 15], яка базується на спектрофотометричному моніторингу вивільнення ненасичених продуктів з полігалактуроната, що поглинають при 235 нм. Реакційна суміш містила 0,23 % ПГН, 0,3 мМ CaCl₂ та 0,1 М трис-НСІ (рН 8,5). За одиницю активності приймали кількість ферменту, яка спричинює збільшення поглинання на 1,6 опт. од. за 1 хв при даних умовах та температурі 37 °C, що відповідає вивільненню 1 мкМ ненасичених уронідів [16].

Геноінженерні методи. Виділення плазмід та хромосомної ДНК, гідроліз ендонуклеазами рестрикції, лігування та ДНК електрофорез проводили за стандартними методиками [17]. Для отримання компетентних клітин та трансформації користувалися методом [18]. Для створення геномної бібліотеки хромосомну ДНК *K. oxytoca* VN13 частково гідролізували ендонуклеазою *Sau3A* і фрагменти розміром 4—9 тис. п. н. елюювали з агарозного гелю. Далі фрагменти лігували з вектором *pUC19*, попередньо розщепленим *BamHI* та обробленим лужною фосфатазою («Boehringer Mannheim», Німеччина).

Для визначення нуклеотидної послідовності клонованого фрагмента створено ряд субклонів на основі векторів *pUC19*, *pUC28* і *pBluescript(-)*. Первинну послідовність ДНК клонованого фрагмента визначали за методом Сенгера [19], використовуючи апарат ALF express™ та Cy5™ AutoCycle набір фірми «Pharmacia Biotech» (Швеція); частину нуклеотидної послідовності отримали з сервісу «MWG AG Biotech» (Німеччина). Для аналізу ДНК та поліпептидного продукту використовували програми «Generunner», NNPP (Neural Network Promoter Prediction) (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) та «SignalP prediction 2.0» [20] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) з рекурсив центру «Biological Sequence Analysis Bio-Centrum-DTU» (Данія) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) та «Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP)» (http://www.fruitfly.org/seq_tools/), а також програми *blastn* та *blastx* електронної служби Blast Національного центру біотехнологічної інформації (США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Визначена нуклеотидна послідовність *pelX* гена, яка наведена в цій статті, зареєстрована в EMBL, GenBank та DDBJ під номером AF454849.

Результати і обговорення. Клонування *pelX* гена. Геномну бібліотеку, що містила фрагменти хромосоми *K. oxytoca* VN13 розміром 4—9 тис. п. н., використано для пошуку генів пектинолілізу. Близько 1000 клонів трансформантів перевірено на наявність пектолітичної активності на селективному Pec-SSA середовищі та ідентифіковано один позитивний клон. Рестрикційний аналіз плазмід, виділеної з цього клону, продемонстрував, що *pPL11* містить інсерцію розміром 5,2 тис. п. н. Подальший делеційний аналіз дав змогу зменшити розмір клонованого фрагмента до 3 тис. п. н. *SacI-EcoRV* фрагмента без втрати здатності клону, що несе плазмиду з такою інсерцією, до занурення в поліпектатний гель (рис. 1).

Загальна пектатліазна активність штамів *K. oxytoca* VN13, *E. coli* JM 109 та *E. coli* JM 109, трансформованої плазмідною *pLC28P*

Штам	Загальна пектатліазна активність, мм·хв ⁻¹ ·мл ⁻¹	
	Без індуктора	0,2 %-й полігалактуронат натрію
<i>K. oxytoca</i> VN13	0,0024	0,014
<i>E. coli</i> JM109 (<i>pLC28P</i>)	0,024	0,024
<i>E. coli</i> JM109	0	0

Для визначення пектатліазної активності клонованого гена використовували лізати нічних культур *K. oxytoca* VN13, *E. coli* JM109 без плазміди та *E. coli* JM109, що була трансформована *pLC28P*. З метою підвищення пектатліазної активності *K. oxytoca*, яка виявилася загалом низькою, використовували лізати культур, вирощені на мінімальному середовищі з гліцерином без індукції та з додаванням ПГН в середній логарифмічній фазі росту культури, що сприяє підвищенню пектатліазної активності *K. oxytoca*. Експеримент засвідчив високий рівень пектатліазної активності для штаму *E. coli* JM109, трансформованого *pLC28P*, на фоні в 10 разів нижчої загальної активності *K. oxytoca* VN13 у варіанті без індукції та в 2 рази нижчої у разі такої індукції (таблиця).

Визначення та аналіз нуклеотидної послідовності *pelX* гена. Визначено нуклеотидну послідовність *AgeI-EcoRV* фрагмента *pLC28P* розміром 2950 п. н. (рис. 1). Аналіз послідовності виявив наявність відкритої рамки зчитування (BP3), що починається АТГ-кодоном у позиції 609 (рис. 2). Інший потенційний трансляційний старт знаходиться в позиції 681. BP3 закінчується ТAA (*ochge*) стоп-кодоном у позиції 2805. На відстані 15 п. н. у напрямку транскрипції знаходиться ще один ТAA стоп-кодон, за яким іде GC-багатий інвертований повтор з вирахованою $\Delta G = -11,7$ кДж·моль⁻¹ для РНК при температурі 25 °С та поліТ-ланцюг, що складається з п'яти нуклеотидів (рис. 2). Ця структура може бути задіяна в термінації транскрипції гена *pelX*.

Первинний продукт трансляції, визначений програмою «Genrunner», складає 732 амінокислотні залишки та має вираховану ізоелектричну точку $pI = 6,34$. Цей поліпептид демонструє 61 %-ву ідентичність за амінокислотною послідовністю щодо екзополігалактуронатліази *E. chrysanthemi*

(A37839) та не має гомології з бактеріальними ендопектатліазами. В межах клонованого фрагмента знайдено початок ще однієї BP3, що розташована на 315 нуклеотидів вище *pelX* та протилежно спрямована і має 86 %-й рівень ідентичності з N-кінцем N-ацетилглюкозамін-1-фосфат-уридилтрансферази *E. coli*, яка бере участь у синтезі пептидогліканів (рис. 1).

Для пошуку потенційного промотору *pelX* гена використано програму NNPP, за допомогою якої знайдено два потенційних промотори з високим рейтингом за критеріями, що враховуються програмою (рис. 2). Не було виявлено близького до консенсусного сайту зв'язування з рибосомами ні перед першим, ні перед другим АТГ-кодонами. Оскільки більшість пектиназних генів бактерій роду *Erwinia* контролюється KdgR-репресором, ми шукали потенційні KdgR-оператори в промоторній ділянці *pelX* гена. KdgR-оператор являє собою два недосконалих інвертованих повтори по 9 нуклеотидів (AATRAAAYRNYRTTTYATT, де R — пурин, Y — піримідин, N — будь-який нуклеотид). Знайдено два потенційних KdgR-оператори, послідовності яких збігаються з консенсусом (15 з 18 та 16 з 18 нуклеотидів), локалізованих у позиціях 539—557 та 581—599 відповідно (рис. 2). Розташованість KdgR-операторів всередині промоторної ділянки *pelX* вказує на репресію оперона в разі відсутності індукторів. У *E. chrysanthemi* індукторами експресії пектиназних генів виступають проміжні продукти катаболізму пектину, в даному випадку — 5-кето-4-деоксіуронат (DKI), 2,5-дикето-3-деоксиглюконат (DKII) та 2-кето-3-деоксиглюконат (KDG) [8]. Слід зазначити, що *E. coli* має здатність катаболізувати гексуроніди, і головним регулятором транскрипції задіяних генів є також KdgR (індуктором у цьому разі є проміжний продукт розщеплення гексуронідів — KDG). Консервативність амінокислотної послідовності KdgR у цих двох видів бактерій сягає 90 %. Відсутність різниці у показнику активності *E. coli* з плазмідною *pLC28P* (таблиця) у варіантах як з індукцією, так і без неї є результатом відсутності у *E. coli* генів пектинолізису і неможливості утворення справжніх індукторів з ПГН.

Оскільки головні пектатліази бактерій роду *Erwinia* та, насамперед, PelX є секреторними білками, ми шукали потенційний сигнальний пептид на N-кінці первинного *pelX*-транслянта. Для цього використовували програму «SignalP prediction 2.0». Згідно з висновками програми, ймовірність того, що послідовність з 32 амінокислотних залишків, яка транслюється з першого АТГ даної BP3, є сигнальним пептидом, складає 95 % (рис. 2).

1 atcttcatcgtcgtgaagaacggcgccgctgctgcatggcgtggccggtaccaagctgtt
76 ccagttaagattgtettegegcagcgtctggcgaaagcaggctgcccgccgtgcccgtacacca
151 tgcccctaattctttagccgcatcaataacatgctgcccaccatcggtttccggccagcgaat
226 aagatcggataacatgcccgtacctttgctgcccgaagaataaccacgctcatcggactgt
301 cctgactgctgttagaacgaaaagtaaaagcctttcacggtgaaatatctacatatttttca
376 cgaagataaaacgcacaagcgtaacgctatacaccattttaggtgggtatTTTTAGCCAGCG
451 cgcaaaaaagcattttaacggggagggataccggctatccctctgcttttgctgtttttt

526 agaaaatccataaagtaaaacggggttttaatatgcat taattgtgacgcaataaatagaaa
KdR - оператор рейтинг 0,99 рейтинг +1
M P V N N Y P G E K N E N K I P L A
601 tctgataatgccggttaataattaccaggagaaaaaaatgaaaacaaaatacctttggca
T M I A L P L Q A N E G H Q W R A I A F
676 gtacgatgatcgcgctaccgctgcaggccaacgaaggccatcagtggcgggcaatcgccttt
S N F S S N V L P E K I G V N D V T I A
751 acagtaacttttctcgaacgtgttgccggaaaaaattggcgtaaatgatgtcaccattgcc
P Q D S A D L S Q P I T I E S R G G K I
826 cgccgaggattccgcccgtctcagccagccattaccatcgagagccggggaggtaaaatt
G L T F F Y T E L P T N K N F I L Q A T V
901 acggactgaccttcttttacaccgagctgccaaaccaataagaattttatcctgcaggctacc
F G P E N G A R P A A Q E G A G L L V R
976 agtttggaccggaaaaatggcgcgctccggcgccgaggaaggcgccggactgctggctccgc
P R Q Q P L K V G Y E E F P A A S N M V
1051 acccgcccaacagcctctcaaggctggctacgaagagttcccgccgcatccaatatggtg
T Q D K K D G S H I K L Q A I S R E G I
1126 tgacccaggataaaaaagatggctcgcataatcaagctgcaggctattagccgggaagggata
N A G A A I K R Q S Y K E K I D I Q Q T
1201 gcaatgccccgctgcaatcaagcgtcaaaagtacaagagaaaaatcgatatccagcaacc
K L E R T N D G F I T S W A A T G S N E
1276 ttaagctggaacgtactaacgacggatttattacctcattggcgcccaacggggcagtaaatgaa
V P H A D L I A Q Q D K E H Y Y V G F F
1351 gggttcctcacgcgatctgattgctcagcaggataaagaacattactacgtcggtttcttc
K I T V S N A S L T T S A A N T V P S A
1426 ccaaatcacgctcagcaatgcttcctgacgacctccggcgcaaatacggttccctccgccc
S W P P V M Q I A S G T K S Q S K E Y L
1501 aaagctggccggcgtcatgcaaatgcctcggggacaaaaagccagagcaagagtatctcc
N S D G R I T V R Q D E V V I G Q D K A V
1576 cgaatagtgacggacgatcaccgctgcgctcaggatgaagtgggtgatccgggaggataaagcc
M Y T Q P A V L K D K S T F E I S F T P
1651 agatgtatacccagcctgcccgttctgaaagataaaagcacattcgaaattagcttactcca
T L T Q T L T V E Q S A N V T G N T L Y
1726 acacgctgacccaacgctgacgggtgaacagagcgcgaatgtgacaggcaatacgtgtagc
L S Q A K G T T D S P L D L A T A V D L V
1801 ggctgtcgcaggctaaagggacgacggactcgccgctggatntagccaccgctgtcgcacctc
Q I V L A A V I I R K Q P S R L A P R L
1876 ggcaaatgtattagccgagtgattatccgcaaacaccatcccggtagcggccagcctg
T L K A D G K A V I H G L L L D A S Y W
1951 aaaccctgaaagccgacggaagccgctgattcacgggctcctgctggatgccagctactgg
D I T D K S L R V Q G S H N L I E N V T
2026 tagacattacggacaagagcctgcccgtacagggtagccataacctgatcgagaacgtcacc

D T G I Q I S S P A D V G R P L W A S H N R V V N
 2101 atgataccgggcattcaaatctcctcctccggcgatgtcggacgcccgtgtggggccagccataaacggggtggtga
 S E S F N N E D P G K I N A D G F A V K M R V G E
 2176 attctgaatcctttaataacgaagatccgggtaaaattaacgcccgatggcctttgcggtgaaaatgcccgtagggg
 G N R L E G C Y S H D N I D D G F D L F N K I E D
 2251 agggtaaccggctggagggctgttactcacacgataaatatcgacgacggcttcgacctgttcaataagattgagg
 G A N G V V V I E N S I A R N N T S N G F K L G G
 2326 acggcgctaaccggcgttgggtgatcgagaactccattgcccgaataataaccagcaacggctttaagctcgggtg
 E G Q P V A H E V R N S I A I G N H L D G F T D N
 2401 gggaaagggcagccggctcggccacgaggtacgcaacagcatcgccatcgccaatcatctggacgggtttaccgaca
 F N P G K L V V V N N V A V D N Q R F N Y L F R P
 2476 acttcaatcctggcaagctggtagtgggtcaataacgctcggcgggtgataaccagcggctttaactatctattccggc
 S P Y G A P E T Q G T F S D N L S L R S Q P G K Y
 2551 caagcccgtatggcgcaccgggaaacgcaggggtaccttcagcgataaacctttctcctgcccagccagccggggaaat
 D D A V I G N I D D S N Y F I H G G R S I N A Q G
 2626 atgacgatgccggttatcgggaacattgatgatagcaactactttatccacgggtggccgaagcatcaacggcccagg
 K S I H S A D Y Q T L T L P D P L T R E A D G S F
 2701 gaaagagcattcacagcggcggactatcagactctgacgctgcccggatccgctgacggcgtgagggccgacggcagct
 N T G N F L S R N
 2776 ttaacaccgggtaacttcttagcggcaattaaccagggacacgctaaaaacataaaggctcgccctcggggcagct
 2851 tttacttctcttctcctgcttcacaccgcatggtgtgctggttttagtttagcgggtacagcgcataaagcagctctggng
 2926 agcggcttcttagtggttgacgtac

Рис. 2. Нуклеотидна послідовність, визначена для *pelX* гена *K. oxytoca* VN13. Наведено передбачену амінокислотну послідовність первинного *pelX*-поліпептиду в однолітерному коді. Жирним шрифтом виділено трансляційні старт- та стоп-кодони. Варіанти потенційних промоторів підкреслено двома жирними лініями та вказано вирахуваний NNPP-програмою рейтинг. Операторні ділянки для *KdgR*-регулятора взято в рамки та залито сірим кольором. Сигнальний пептид підкреслено. Послідовність, яка може утворювати шпильку та потенційно задіяна в термінації транскрипції, підкреслено лініями зі стрілками. Показано поліТ-ланцюг

Отже, нами клоновано ген пектатліази зі створеного банку генів *K. oxytoca* VN13 та визначено повну нуклеотидну послідовність фрагмента, який містить *pelX* ген та початок суміжного гена. Наявність гомології поліпептиду, що транслюється з *pelX*, з екзосубстратами інших бактерій та відсутність гомології з ендоексубстратами можуть свідчити про екзосубстратну специфічність *pelX*. Існування та локалізація в промоторній ділянці *pelX* двох операторів для зв'язування репресора катаболізму галактуронату і його похідних *KdgR* відносно старту транскрипції і трансляції вказують на репресію даного оперона в разі відсутності індукторів, що характерно для більшості пектиназних генів бактерій роду *Erwinia*. Наявність сигнального пептиду, виявленого на N-кінці *pelX*, свідчить про позацитоплазматичну локалізацію даного ферменту.

Лишається невідомим, які фактори впливають на експресію клонованого гена та роль, що відіграє *pelX* у проникненні бактерій *K. oxytoca* VN13 в корені рослин.

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

Cloning and analysis of the pectate lyase *pelX* gene of *Klebsiella oxytoca* VN13

Summary

The pectate lyase *pelX* gene of *K. oxytoca* VN13 was cloned and sequenced. The aminoacid sequence deduced was compared with the related peptides of other bacteria. Potential promoters were defined. Two *KdgR*-boxes located in the promoter region prove inducibility of the operon. The amino-terminal signal sequence for *pelX* was exhibited.

E. B. Lar, G. L. Kovtunovich, N. A. Kozirovskaya

Клонирование и анализ гена пектатлиазы *pelX* *Klebsiella oxytoca* VN13

Резюме

Клонирован ген пектатлиазы *pelX* *K. oxytoca* VN13, определена его нуклеотидная последовательность. Проведен сравнительный анализ гомологии кодируемого им полипептида с соответствующими белками других бактерий. Определен потенциальный промоторный участок нуклеотидной последовательности. Наличие двух операторов для *KdgR*-репрессора в пределах

промоторной области свидетельствует об индуцибельности указанного оперона. Показано наличие сигнальной последовательности на N-конце первичного транслята данного фермента.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hirota Y., Fujii T., Sano Y., Iyana S. Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice // *Nature*.—1978.—276.—P. 416—417.
2. Kim Y.-M., Ahn K.-J., Beppu D., Uozumi T. Nucleotide sequence of the *nifLA* operon of *Klebsiella oxytoca* NG13 and characterization of the gene products // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—205.—P. 253—259.
3. Нгуен Т. Х., Тон Т. Б., Тарасенко В. А., Козыровская Н. А. Азотфиксирующие бактерии колонизуют ксилему корня риса // *Биополимеры и клетка*.—1989.—5, № 2.—С. 97—99.
4. Verma S. C., Ladha J. K., Tripathi A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice // *J. Biotechnol.*—2001.—4, N 91 (2—3).—P. 127—41.
5. Белявская Н. А., Козыровская Н. А., Кучеренко Л. А., Кордюм Е. Л., Кордюм В. А. Взаимоотношения бактерий рода *Klebsiella* с растением 1. Электронно-микроскопический анализ взаимодействия эндофитных микроорганизмов с корнями проростков риса // *Биополимеры и клетка*.—1995.—11, № 1.—С. 55—61.
6. Петак А. М., Ковтунович Г. Л., Козыровская Н. А., Туряница А. И., Кордюм В. А. Взаимоотношения бактерий рода *Klebsiella* с растением 2. Локализация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *K. terrigena* в тканях табака и пшеницы // *Биополимеры и клетка*.—1995.—11, № 6.—С. 75—80.
7. Kozzyrovskaya N., Kovtunovych G., Lar O., Kamalova S., Korodyum V., Kleiner D. Correlation between pectate lyase activity and ability to penetrate into plant tissues by diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN13 // *Plant and Soil*.—1999.—260.—P. 1—6.
8. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* // *Annu. Rev. Microbiol.*—1996.—50.—С. 213—257.
9. Von Reisen V. L. Pectinolytic, indol-positive strains of *Klebsiella pneumonia* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1976.—26.—P. 143—145.
10. 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.
11. Ковтунович Г. Л., Лар О. В., Козыровська Н. А. Клонвання та структурний аналіз *peh* гена *Klebsiella oxytoca* VN13 // *Биополимеры и клетка*.—2000.—16, № 5.—P. 356—363.
12. Ковтунович Г. Л., Лар О. В., Козыровська Н. О. Роль гена екзополігалактуронози у процесах взаємодії *Klebsiella oxytoca* VN13 з коренями проростків пшениці // *Биополимеры и клетка*.—2002.—18, № 4.—С. 319—323.
13. Miller J. H. Experiments in molecular genetics.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1972.—P. 431.
14. 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.
15. Moran F., Starr M. P. Metabolic regulation of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia* // *Eur. J. Biochem.*—1969.—11.—P. 291—295.
16. Евтушенков А. Н., Фомичев Ю. К. Секреция пектатлиаз клетками *Erwinia chrysanthemi* и *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* // *Микробиология*.—1996.—65, № 3.—С. 333—338.
17. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
18. 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.
19. Sanger F., Nicken S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1977.—74.—P. 5463—5467.
20. Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites // *Protein Engin.*—1997.—10.—P. 1—6.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 31.01.02