ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2005. Т. 21. № 1



# Роль *pelX* гена *Klebsiella oxytoca* VN13 у процесі пектинолізису

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

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

*Інсерційним мутагенезом in vitro з наступним заміщенням натівної хромосомної копії pelX гена на мутовану створено дефектний за продукцією екзопектатліази штам K. oxytoca VN13. За допомогою створеного мутанта встановлено наявність у геномі K. oxytoca VN13 лише одного гена з даною нуклеотидною послідовністю. Показано, що у K. oxytoca VN13 є додатковий пектатліазний ген, нуклеотидна послідовність якого суттєво відрізняється від послідовності pelX гена. Виявлено суттєво нижчий рівень пектатліазної активності мутантного штаму порівняно із загальною пектатліазною активністю K. oxytoca VN13 дикого типу. Визначено, що експресія клонованого pelX гена не є необхідною для засвоєння полігалактуронату цією бактерією.*

*Ключові слова: Klebsiella oxytoca, пектинолізис, інсерційний мутагенез, pel-X ген.*

**Вступ.** Інтерес до вивчення пектолітичних ферментів *K. oxytoca* VN13, що використовується як основа для створення біопрепаратів комплексної дії для рослинництва, пов'язаний з поміченою нами раніше кореляцією між рівнем синтезу пектолітичних ферментів та ефективністю внутрішньої колонізації коренів рослин цією бактерією [1]. Така властивість надає *K. oxytoca* VN13 низку переваг, у тому числі дозволяє ефективно конкурувати з патогенною мікрофлорою, а також швидко відновлювати популяцію зовнішньої поверхні кореня в разі вимирання бактерій при несприятливих умовах. Раніше нами клоновано *pehX* та *pelX* гени *K. oxytoca* VN13 [2, 3], які кодують екзополігалактуроназу та екзопектатліазу відповідно. Також грунтовно було вивчено роль кодованої *pehX* екзополігалактуронази при взаємодії *K. oxytoca* VN13 з коренями паростків пшениці [4].

Мета даної роботи полягала в створенні мутантного штаму *K. oxytoca* VN13 з інактивованим *pelX* геном і в дослідженні ролі кодованої ним пектатліази у процесі пектинолізису. Такий підхід надає можливість встановити також наявність чи відсутність у *K. oxytoca* інших пектолітичних ферментів, які належать до класу ліаз.

**Матеріали і методи.** *Бактеріальні штами і плазміди.* Використані штами і плазміди наведено в табл. 1 і 2 відповідно.

*Бактеріальні середовища і умови вирощування.* Бактерії вирощували на середовищі LB та мінімальному середовищі M9 [9]. Антибіотики ампіцилін і рифампіцин використовували в концентрації 100 мкг/мл, канаміцин — 50 мкг/мл, хлорамфенікол — 60 мкг/мл.

*Біохімічне визначення пектатліазної активності.* Загальну пектатліазну активність у лізатах бактеріальних культур вимірювали за методом, що базується на спектрофотометричному моніторингу вивільнення ненасичених продуктів з полігалактуронату натрію, які мають максимум поглинання при 235 нм [10]. За одиницю активності брали кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль ненасичених уронідів з полігалактуронату за 1 хв.

© О. В. ЛАР, Г. Л. КОВТУНОВИЧ, Н. О. КОЗИРОВСЬКА, 2005

*Таблиця 1*
*Використані штами мікроорганізмів*

| Штам | Фенотип або генотип | Джерело |
|---|---|---|
| *Escherichia coli* JM109 | *thi*, Δ(*lac-proAB*), *F'* [*traD36*, *proAB+*, *laqI*$^q$*Z-M15*] | Колекція відділу |
| *E. coli* S17-1 λpir | *pro*, *RP4-2* (*Tc::Mu*, *Km::Tn7*), Tp$^R$, Sm$^R$, *λpir* | Те саме |
| *Klebsiella oxytoca* VN13 | Rif$^R$, Ap$^R$ | ←» |

*Таблиця 2*
*Використані плазміди*

| Плазміда | Фенотип | Реплікон | Джерело |
|---|---|---|---|
| *pUC19* | Ap$^R$ | ColE1 | [5] |
| *pUC28* | Ap$^R$ | ColE1 | [6] |
| *pHP45ΩCm* | Ap$^R$, Cm$^R$ | — | [7] |
| *pJP5603* | Km$^R$ | R6K | [8] |
| *pLC28P* | Ap$^R$ | ColE1 | [3] |
| *pLC28P::Cm* | Ap$^R$, Cm$^R$ | ColE1 | Дана робота |
| *pFU101* | Km$^R$, Cm$^R$ | R6K | Дана робота |

теріальних лізатів, вирівняних за оптичною густиною.

*Генно-інженерні методи.* Виділення плазмід і хромосомної ДНК, гідроліз ендонуклеазами рестрикції, лігування, гель-електрофорез, елюцію ДНК з гелю та перенос фрагментів ДНК з агарозного гелю на нейлонову мембрану для блот-гібридизації здійснювали за стандартними методиками [11]. Гібридизацію проводили із застосуванням набору для мічення та детекції фірми «Boehringer Mannheim» (ФРН), до складу якого входить дигоксигенінова мітка. Для отримання компетентних клітин бактерій та трансформації користувалися методом Нішімура [12].

*Кон'югацію* здійснювали за стандартною методикою [9] з використанням *Escherichia coli* S17-λpir як мобілізуючого штаму.

**Результати і обговорення.** *Створення мутантного штаму K. oxytoca VN13 з інактивованим pelX геном.* На першому етапі роботи проводили інактивацію *pelX* гена *in vitro*. Для цього в кодувальну частину *pelX* по унікальному *EcoRI* сайту клонували ДНК-фрагмент плазміди *pHP45ΩCm* розміром 3,6 тис. п. н., який містить послідовність *cat* гена та кодує резистентність до хлорамфеніколу (Cm$^R$). Подібним чином отримували конструкцію *pLC28P::Cm* розміром 9,3 тис. п. н., що містить *cat* ген у структурній частині *pelX* гена (рис. 1).

Факт інактивації *pelX* гена підтвердила нездатність штамів *E. coli* з плазмідою *pLC28P::Cm* до продукування пектатліази.

Для перенесення мутантного гена в хромосому *K. oxytoca* VN13 використано плазміду *pJP5603*, реплікація якої потребує допоміжного *π* білка і тому в *K. oxytoca* VN13 не підтримується. Ця плазміда може бути ефективно мобілізована зі штаму *E. coli* S17-1 λpir через наявність у її послідовності *mob* сайта плазміди *RP4*.

Клонуванням *XbaI-SacI* фрагмента плазміди *pLC28P::Cm* у вектор *pJP5603* отримано конструкцію *pFU101* розміром 9,7 тис. п. н., яку використовували для створення *pelX*$^-$ мутанта *K. oxytoca* VN13 *in vivo*. Мобілізувальний штам *E. coli* S17-1 λpir трансформували плазмідою *pFU101* для забезпечення кон'югативного переносу плазміди в *K. oxytoca* VN13.

У результаті кон'югації одержано 5000 клонів транскон'югантів, резистентних до рифампіцину, канаміцину і хлорамфеніколу та стійких до стрептоміцину, що вказує на успішний перенос *pFU101* з *E. coli* S17-1 λpir у *K. oxytoca* VN13 та її інтеграцію в хромосому, обумовлену гомологічною рекомбінацією одного з фрагментів *pelX* гена плазміди і нативного *pelX* гена. Відсутність плазмідної ДНК у перевірених методом лужного лізису клонах підтвердила внутрішньохромосомну локалізацію

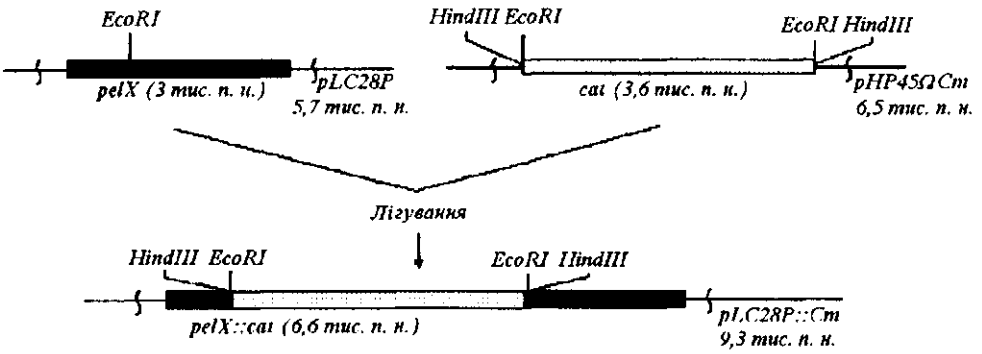


Рис. 1. Схема інактивації *pelX* гена інсерційним мутагенезом *in vitro*

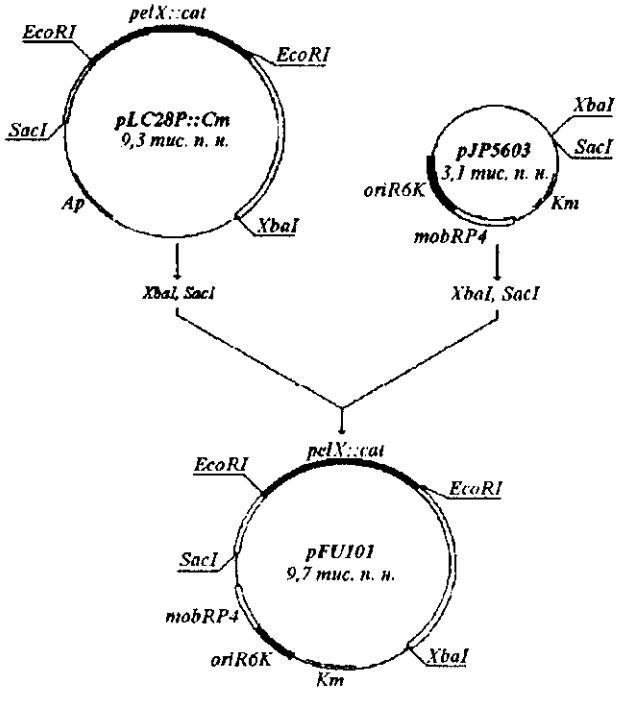


Рис. 2. Схема створення конструкції для направленого мутагенезу *pelX* гена *in vivo*

ДНК. Загальна ефективність процесу переносу плазміди та її рекомбінації з хромосомною ДНК *K. oxytoca* VN13 склала $7{,}7 \cdot 10^{-7}$ на клітину реципієнта.

Два з отриманих клонів було взято для подальшої селекції і отримання клонів з вищепленою векторною частиною. Бактерії культивували в рідкому середовищі LB з рифампіцином. Після 15 пасажів, що відповідає 150 генераціям, серед отриманих $Rif^RCm^R$ клонів виявлено два чутливих до канаміцину. Останнє може вказувати на втрату векторної частини та інактивацію хромосомної копії *pelX* гена *K. oxytoca* VN13.

*Перевірка генотипу створених мутантних клонів K. oxytoca VN13 з інактивованим pelX геном.* Для перевірки потенційно мутантних $Rif^RCm^RKm^S$ клонів *K. oxytoca* VN13 використовували метод ДНК-ДНК блот-гібридизації. Тотальну ДНК $Cm^RKm^S$ клонів, а також *K. oxytoca* VN13 дикого типу гідролізували окремо рестриктазами *BglII*, сайт рестрикції для якої відсутній всередині *pelX* гена з інсерцією, та *HindIII*, гідроліз якою вищеплює ген *cat* з *pelX* гена (рис. 2). Після електрофорезу гідролізатів в агарозному гелі ДНК переносили на нейлонові фільтри методом капілярного переносу. Мембрани використовували для гібридизації: одну — для виявлення гена стійкості до хлорамфеніколу з *HindIII* фрагментом плазміди *pHP45ΩCm* розміром 3,6 тис. п. н. (як зонд); другу — для ідентифікації гена *pelX*. Гібридизацію проводили з *SacI-XbaI* фрагментом *pLC28P* розміром 3,0 тис. п. н., що містить повну послідовність гена *pelX*.

Гібридизація з *pelX* зондом показала, що клони мутантів, гідролізованих *BglII*, представлено однією гібридизаційною смугою, те ж саме спостерігалося для ДНК *K. oxytoca* дикого типу (рис. 3, *а*). Видно, що гібридизаційні смуги, які відповідають фрагменту ДНК, що містить *pelX* ген, мутантних клонів мають більшу молекулярну масу через вставку *cat* гена, ніж аналогічна смуга ДНК *K. oxytoca* VN13 дикого типу. ДНК клонів мутантів, розщеплена рестриктазою *HindIII* (рис. 3, *а*), представлені двома гібридизаційними смугами. Це пояснюється тим, що фермент *HindIII* вищеплює вставку з *cat* геном і ділить фрагмент з *pelX* геном на дві частини, кожна з яких і гібридизується із зондом. У варіанті з ДНК *K. oxytoca* VN13 дикого типу, теж обробленою *HindIII*, спостерігається лише одна смуга, що є результатом відсутності сайта рестрикції для даної рестриктази всередині *pelX K. oxytoca* VN13.

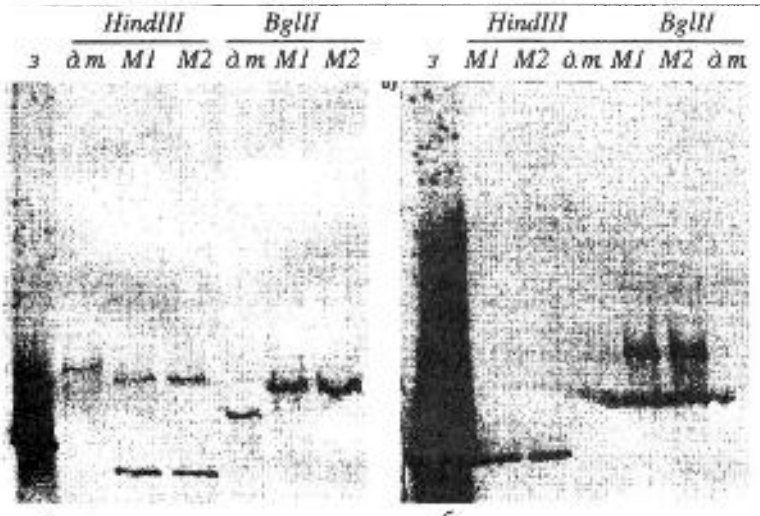


Рис. 3. Гібридизація рестрикційних фрагментів, утворених ендонуклеазами *HindIII* і *BglII*, із зондами до генів *pelX* (*а*) і *cat* (*б*): *з* — зонд; *д. т.* — ДНК *K. oxytoca* VN13 дикого типу; *M1* і *M2* — ДНК мутантних клонів

VN13 дикого типу, теж обробленою *HindIII*, спостерігається лише одна смуга, що є результатом відсутності сайта рестрикції для даної рестриктази всередині *pelX K. oxytoca* VN13.

При гібридизації з *cat* зондом показано, що обидва мутанти мають цей ген у хромосомі (рис. 3, *б*). Ген *cat* представлений у цих мутантів однією копією. Гібридизаційна смуга у ДНК клонів мутантів, розщеплена рестриктазою *HindIII* (рис. 3, *б*), відповідає розміру фрагмента вставки *cat* гена в *pelX*, що вищеплюється даною рестриктазою.

Отже, результати гібридизаційного аналізу свідчать про те, що перевірені клони транскон'югантів є мутантами з інактивованим за рахунок інсерції *cat* гена геном *pelX*. Цей експеримент дає також можливість пересвідчитися, що *K. oxytoca* VN13 має в геномі лише одну копію *pel* гена з даною нуклеотидною послідовністю.

*Визначення наявності в геномі K. oxytoca VN13 додаткового пектатліазного гена.* Щоб перевірити наявність у геномі *K. oxytoca* VN13 додаткових пектатліазних генів проведено вимірювання пектатліазної активності створеного мутанта. Оскільки загальна пектатліазна активність *K. oxytoca* VN13 є досить низькою за відсутності індукції продуктами пектинового катаболізму, то при вирощуванні культур бактерій *K. oxytoca* VN13 дикого типу та одного з отриманих мутантних клонів до мінімального середовища М9 з гліцерином як джерелом вуглецю додавали полігалактуронат натрію до концентрації 0,2 %, продукти катаболітного перетворення якого відомі як індуктори експресії генів пектинолізису. Отримані результати наведено нижче:

| Варіант | Пектатліазна активність, мкМ · хв$^{-1}$ · мл$^{-1}$ |
|---|---|
| *K. oxytoca* VN13, дикий тип | 0,024 |
| *K. oxytoca* VN13, *pelX мутант* | 0,014 |

Суттєвий рівень пектатліазної активності створеного мутантного штаму *K. oxytoca* VN13, безсумнівно, вказує на наявність у геномі даної бактерії більш ніж одного пектатліазного гена (генів). Такий результат добре узгоджується з літературними даними [13] про наявність у *K. oxytoca* двох пектатліазних генів, нуклеотидну послідовність яких не було визначено. Дані блот-гібридизації, у свою чергу, дозволяють стверджувати, що нуклеотидна послідовність додаткового пектатліазного гена *K. oxytoca* VN13 суттєво відрізняється від послідовності гена *pelX*.

*Засвоєння полігалактуронату мутованим штамом.* Раніше нами встановлено, що *K. oxytoca* VN13 дикого типу не здатна до засвоєння полігалактуронату натрію як єдиного джерела вуглецю при рості на мінімальному середовищі. Але в результаті спонтанного мутагенезу клони, здатні до росту на мінімальному середовищі з полігалактуронатом натрію у популяції *K. oxytoca* VN13, з'являються [1]. Вони отримали назву $Pel^{+}$ форм, оскільки характеризуються підвищеним рівнем пектатліазної активності у порівнянні з диким типом. Дослідження $pelX^{-}$ мутанта показали, що даний штам утворює $Pel^{+}$ форми з тією ж частотою, що й дикий тип *K. oxytoca* VN13. Клони мутанта ефективно засвоюють полігалактуронат у разі відсутності інших джерел вуглецю в середовищі.

Отже, експресія клонованого *pelX* гена не є необхідною для засвоєння полігалактуронату. За даними літератури, екзопектинази ервіній не відіграють суттєвої ролі в процесі деградації полігалактуронату порівняно з ендопектиназами [14].

*O. V. Lar, G. L. Kovtunovych, N. O. Kozyrovska*

Role of the *pelX* gene of *Klebsiella oxytoca* VN13 in pectinolysis

Summary

*An insertionally inactivated copy of the pelX gene of K. oxytoca VN13 was used for the wild type gene substitution by reciprocal recombination. The presence in K. oxytoca VN13 genome of the additional pectate lyase gene with nucleotide sequence differing from the pelX gene was revealed. A considerably lower level of the pectate lyase activity of the mutant K. oxytoca VN13 strain compared to the wild type strain was determined. It was shown, that the pelX gene expression is not essential for polygalacturonate assimilation by this bacterium.*

*Key words: Klebsiella oxytoca, pectinolysis, insersion mutagenesis, the pelX gene.*

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

Роль *pelX* гена *Klebsiella oxytoca* VN13 в процессе пектинолизиса

Резюме

*Инсерционным мутагенезом in vitro с последующим замещением нативной хромосомной копии pelX гена мутированной создан дефектный по продукции екзопектатлиазы штамм K. oxytoca VN13. При помощи созданного мутанта определено наличие в геноме K. oxytoca VN13 только одного гена с данной нуклеотидной последовательностью. Показано, что у K. oxytoca VN13 есть дополнительный пектатлиазный ген, нуклеотидная последовательность которого существенно отличается от последовательности pelX гена. Выявлен существенно более низкий уровень пектатлиазной активности мутантного штамма в сравнении с общей пектатлиазной активностью K. oxytoca VN13 дикого типа. Установлено, что экспрессия клонированного pelX гена не является необходимой для усвоения полигалактуроната этой бактерией.*

*Ключевые слова: Klebsiella oxytoca, пектинолизис, инсерционный мутагенез, pelX ген.*

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Kovtunovych G., Lar O., Kamalova S., Kordyum V., Kleiner D., Kozyrovska N.* Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN13 to penetrate into plant tissues // Plant and Soil.—1999.—215.—P. 1—6.
2. *Ковтунович Г. Л., Лар О. В., Козировська Н. О.* Клонування та структурний аналіз *peh*-гена *Klebsiella oxytoca* VN13 // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 5.—С. 356—362.
3. *Лар О. В., Ковтунович Г. Л., Козировська Н. О.* Клонування і аналіз гена пектатліази *pelX Klebsiella oxytoca* VN13 // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 5.—С. 417—422.
4. *Ковтунович Г. Л., Лар О. В., Козировська Н. О.* Роль гена екзополігалактуронази у процесах взаємодії *Klebsiella oxytoca* VN13 з коренями проростків пшениці // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 4.—С. 319—323.
5. *Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J.* Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and *pUC19* vectors // Gene.—1985.—33, N 1.—P. 103—119.
6. *Benes V., Hostomsky Z., Arnold L., Paces V.* M13 and *pUC* vectors with new unique restriction sites for cloning // Gene.—1993.—130, N 1.—P. 151—152.
7. *Fellay R., Frey J., Krish H.* Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria // Gene.—1987.—52, N 2.—P. 147—154.
8. *Penford R., Pemberton J.* An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria // Gene.—1992.—118, N 1.—P. 145—146.
9. *Miller J.* Experiments in molecular genetics.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1972.—431 p.
10. *Starr M., Chatterjee A., Starr P., Buhanan G.* Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures // J. Clin. Microbiol.—1977.—N 6.—P. 379—386.
11. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* Molecular Cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
12. *Nishimura A., Morita M., Sugino Y.* Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 20.—P. 6169.
13. *Walker M., Pemberton J.* Construction of a transposon containing a gene for polygalacturonate trans-elinase from *Klebsiella oxytoca* // Arch. Microbiol.—1987.—146.—P. 390—395.
14. *Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S.* Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* // Annu. Rev. Microbiol.—1996.—50.—P. 213—257.

УДК 577.113.5
Надійшла до редакції 26.11.03