

- in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. and Gen. Genet.— 1988.— 213, N 4.— P. 150—154.
22. Newbury S. F., Smith N. H., Higgins C. F. Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon // Cell.— 1987.— 51, N 7.— P. 1131—1143.
 23. Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli* / A. C. Looman, J. Bodlaender, M. de Gruyter et al. // Nucl. Acids Res.— 1986.— 14, N 13.— P. 5481—5497.
 24. Крупская И. В., Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Внутренний промотор *rplJL*-оперона *Escherichia coli* проявляет высокую эффективность в рекомбинантной плазмиде *pNM481* // Генетика.— 1989.— 25, № 1.— С. 154—157.
 25. Kuhlmeier C., Fluhr R., Chua N.-H. Upstream sequences determine the difference in transcript abundance of pea *rpcS* genes // Mol. and Gen. Genet.— 1988.— 212, N 4.— P. 405—411.
 26. Iborra F., Francingues M.-C., Guérineau M. Localization of the upstream regulatory sites of yeast iso2-cytochrome S gene // Ibid.— 1985.— 199, N 2.— P. 117—122.
 27. Friesen J. D., Tropak M., An G. Mutation in the *rplJ* leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // Cell.— 1983.— 32, N 2.— P. 361—369.
 28. Gouy M., Gautier C. Codon usage in bacteria: correlation with gene expression // Nucl. Acids Res.— 1982.— 10, N 25.— P. 7055—7074.
 29. Sharp P. M., Li W.-H. Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for «rare» codons // Ibid.— 1986.— 14, N 19.— P. 7737—7749.
 30. Tinoco I., Uhlenbeck O. C., Levine M. D. Estimation of secondary structure in ribonucleic acids // Nature.— 1971.— 230.— P. 362—367.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 04.06.89

УДК 579.25.4.2.862.1:637.136.5

Л. М. Румер, В. А. Лившиц

ТРАНСФОРМАЦИЯ СФЕРОПЛАСТОВ *STREPTOCOCCUS LACTIS* ПЛАЗМИДАМИ

Определены оптимальные условия получения трансформабельных сферопластов *S. lactis* с помощью лизоцима. Установлено, что жизнеспособность клеток *S. lactis* быстро падает с увеличением концентрации лизоцима и времени инкубации с ним.

Осуществлена трансформация сферопластов чужеродными гетерологичными плазмидами *pRT84* и *pLF2*. Показана экспрессия в клетках *S. lactis* гена *Bacillus amyloliquefaciens*, кодирующего α -амилазу, клонированного в составе *pRT84*.

Введение. Молочные стрептококки широко используются в производстве кисломолочных продуктов и в сыроделии. Некоторые штаммы *S. lactis* являются продуцентами пептидного антибиотика низина, который применяется в качестве консерванта в пищевой промышленности. Трансформация молочных стрептококков плазмидами является важной предпосылкой для их генетического изучения и применения методов генной инженерии в селекционной работе с ними.

В последние годы описано получение протопластов *S. lactis* и трансформация их как собственными, так и некоторыми чужеродными плазмидами [1—10]. В этих работах для удаления клеточной стенки использовали лизоцим из яичного белка, мутанолизин (N-ацетилмурамидазу из *Streptomyces globisporus*) или их комбинацию, а также осуществляли дополнительную обработку клеток протеолитическими ферментами и определенными препаратами α -амилазы [2—4]. Однако описанные методики плохо воспроизводятся в различных лабораториях [11]. Причины, влияющие на эффективность трансформации протопластов *S. lactis* плазмидами, до сих пор слабо изучены. Следует также отметить, что применение мутанолизина для растворения клеточной стенки у молочнокислых бактерий ограничено малодоступностью этого препарата.

Целью настоящей работы является определение оптимальных условий получения трансформабельных сферопластов *S. lactis* с помощью лизоцима. Кроме того, интересно было изучить возможность поддержания в клетках молочных стрептококков некоторых чужеродных плазмид, перспективных для использования их в качестве векторов при молекулярном клонировании.

Материалы и методы. Бактериальные штаммы и плазмиды. Штамм *B. subtilis* (pRT84), содержащий плазмиду pRT84, получен от А. В. Сорокина (ВНИИгенетика). Плазмида pRT84 сконструирована на основе репликона pSM19035, природной плазмиды из *S. pyogenes* [12]. Она имеет размер 8,7 т. п. о. и несет детерминанты индуцибельной устойчивости к эритромицину и ген α -амилазы из *B. amyloliquefaciens* [13]. Штамм *B. subtilis* (pLF2) содержит плазмиду pLF2. Эта плазмида имеет длину 3,3 т. п. о., несет детерминант устойчивости к хлорамфениколу и сконструирована на основе криптоической плазмиды *Lactobacillus fermentum* в нашей лаборатории [14]. Штаммы *S. lactis* LP1T6 и *S. lactis* LM3302 получены от д-ра Л. МэкКэя (США). В работе использованы также устойчивый к рифампицину (rif^r) бесплазмидный производный штамм *S. lactis* LP1T6 — штамм *S. lactis* LMO230 rif^r. Штаммы *S. lactis* 25, *S. lactis* subsp. *acetoinicus* 419, *S. cremoris* 244 получены от В. Ф. Семенихиной (ВНИКМИ, Москва).

Среды. Бациллы культивировали в бульоне Хоттингера. Молочные стрептококки выращивали в среде M21, представляющей собой модифицированную среду M17 [15], в которой β -глицерофосфат натрия заменен фосфатным буфером, как в работе [16]. Среда M21Г содержит 1 % глюкозы; плотные агаризованные среды — 1,5 % агара, полужидкая среда для верхнего слоя — 0,8 % агара. Антибиотики отечественного производства добавляли в среды (если не оговорено) в следующих концентрациях (мкг/мл): рифампицин — 25; хлорамфеникол — 2,5; эритромицин — 5.

Получение и регенерация сферопластов. Ночную культуру исследуемого штамма, полученную в среде M21Г, засеивали в эту же среду, содержащую 20 мМ DL-треонин. Выращивали до середины логарифмической фазы роста (ОП₆₇₀ = 0,8), отмывали клетки в буфере THMS [3] и ресуспендировали их в том же буфере в 1/5 первоначального объема. Раствор лизоцима в буфере THMS добавляли до определенной концентрации и инкубировали при 37 °С различные промежутки времени. Затем клетки отмывали от лизоцима и высевали в верхнем полужидком агаре на плотную среду M21Г. Среда для регенерации сферопластов содержала 0,5 М сахарозу. Параллельно проводили высеивание на среду без осмотического стабилизатора (т. е. без сахарозы). Эффективность образования жизнеспособных сферопластов определяли как отношение разности титров на средах с сахарозой и без нее к титру клеток до инкубации с лизоцимом, выраженное в процентах.

Трансформацию осуществляли в основном по [17]. На один опыт брали клетки, полученные из 20 мл культуры и обрабатывали их лизоцимом (см. выше). Сферопласты отмывали в буфере SMM [17] и ресуспендировали в 0,5 мл того же буфера. Добавляли плазмидную ДНК и 1,5 мл 40 %-ного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000. Смесь инкубировали 20 мин при температуре 20 °С. Затем добавляли буфер SMM, отмывали и ресуспендировали в среде M21Г с 0,5 М сахарозой. После инкубации в течение 1 ч высевали в полужидком агаре на плотную стабилизированную среду M21Г с антибиотиком (для отбора трансформатов) и на среду без антибиотика (для определения титра жизнеспособных сферопластов).

Плазмидную ДНК из клеток *B. subtilis* выделяли по методу Бирнбойма [18]. Для получения плазмид из клеток молочных стрептококков культуры выращивали до середины логарифмической фазы роста в среде M21Г с антибиотиком, устойчивостью к которому детерминируется плазмидой. Клетки отмывали в 0,85 %-ном растворе NaCl и ресуспендировали в растворе, содержащем 20 % сахарозы, 0,25 % ЭДТА, pH 8,0 в 0,03 первоначального объема. Добавляли лизоцим до конечной концентрации 2 мг/мл и инкубировали 30 мин при 37 °С. Все дальнейшие операции проводили, как в работе [18]. После отмывки этанолом препарат ресуспендировали в ТЕ-буфере (трис-НСI — 10 мМ, ЭДТА — 1 мМ, pH 8,0). Для электрофореза плазмидную ДНК выделяли из 10 мл культуры и ресуспендировали в 0,1 мл ТЕ-буфера; для трансформации — из 500 мл культуры и очищали в градиенте плотности хлористого цезия с бромистым этидием.

Электрофорез проводили в 0,8 %-ном агарозном горизонтальном геле при напряжении 15 В/см в течение 2 ч.

Рестриктию осуществляли в соответствии с общепринятыми рекомендациями. Ферменты получали в лаборатории прикладной энзимологии ВНИИгенетика.

Производство α -амилазы определяли на чашках со средой M21, содержащей 1 % крахмала, по образованию вокруг колоний зон гидролиза, не окрашиваемых йодом.

Результаты и обсуждение. Наши попытки осуществить трансформацию непротопластированных клеток *S. lactis* по методу Савдерса и Николсона [11] оказались безуспешными. В связи с этим мы воспроизводили методики, основанные на использовании для этой цели сферопластов. (Как известно, сферопласты — это частичные протопласты, и поскольку мы не определяли полноту удаления клеточной стенки в процессе обработки клеток *S. lactis* лизоцимом, будем называть образующиеся осмотически чувствительные формы сферопластами.)

Влияние концентрации лизоцима и времени инкубации с ним на выживаемость клеток S. lactis

Influence of lysozyme concentration and time of incubation with it on viability of S. lactis cells

Штамм	Концентрация лизоцима, мкг/мл	Время инкубации, мин	Титр клеток на среде М21Г	
			Без сахарозы	С сахарозой
<i>S. lactis</i> LP1T6	0	0	$3 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$
	200	20	$1 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^9$
	200	30	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^9$
	200	60	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^9$
	200	90	$4 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^8$
	200	120	$3 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^7$
	200	150	$1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^7$
	2000	10	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$
<i>S. lactis</i> 25	2000	30	$3 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^6$
	0	0	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$
	50	20	$2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^9$
	100	20	$5 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^8$
<i>S. lactis</i> LM3302	200	20	$6 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^7$
	0	0	10^9	10^9
	2000	10	10^6	$5 \cdot 10^8$
	2000	30	$5 \cdot 10^4$	10^8
	2000	60	10^4	10^7

В ряде сообщений отмечается слабая чувствительность молочных стрептококков к лизоциму [1—5] и рекомендуется использовать для их протопластирования различные концентрации этого фермента. Для получения сферопластов на первом этапе работы мы выращивали бактерии до середины логарифмической фазы в среде М21Г с 20 мМ DL-треонином, инкубировали их в течение 2 ч с 200—2000 мкг/мл лизоцима, а затем высеивали на среды с осмотическим стабилизатором и без него. Оказалось, что в этих условиях сферопласты образуются, но титр жизнеспособных клеток снижается на 2—3 порядка. Изменяя характер буфера для протопластирования, состав среды для регенерации, а также используя различные препараты лизоцима (производства СССР, «Calbiochem», Швейцария, «Serva», ФРГ) и разные штаммы *S. lactis*, мы неизменно наблюдали в данных условиях эксперимента сильное снижение жизнеспособности бактерий. В связи с этим варьировали концентрацию лизоцима и время обработки клеток этим ферментом. Как видно из таблицы, инкубация в течение 2 ч с 200 мкг/мл лизоцима снижает титр клеток штамма *S. lactis* LP1T6 в регенерационной среде на 2 порядка. Если же использовать концентрацию лизоцима 2000 мкг/мл, то титр клеток падает на 3 порядка уже после 30 мин инкубации. В то же время при обработке клеток этого штамма в течение 30 мин 200 мкг/мл лизоцима титр клеток падает всего в 2 раза и при этом 99 % клеток становятся осмотически чувствительными. Таким образом, на жизнеспособность сферопластов штамма LP1T6 сильно влияет концентрация лизоцима и время обработки этим ферментом. По-видимому, в наших условиях лизоцим, полностью растворяя клеточную стенку бактерий, нарушает возможность последующей регенерации протопластов [19]. Аналогичные результаты были получены и с другими штам-

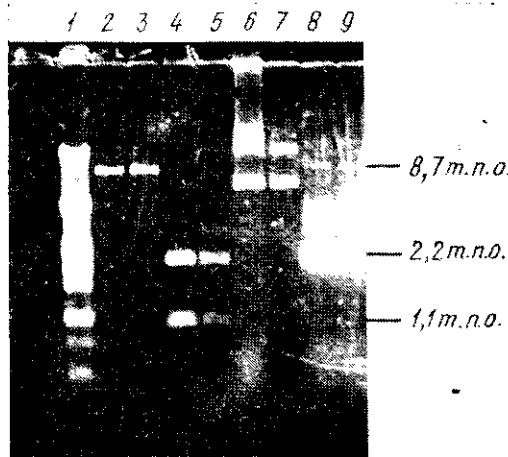
мами молочных стрептококков (25, *S. lactis* subsp. *acetoinicus* 419, *S. cremoris* 244). Вместе с тем видно, что штамм *LM3302* более устойчив к действию лизоцима (таблица).

В последующих экспериментах по трансформации *L. lactis* мы получали сферопласты, обрабатывая клетки лизоцимом в концентрации 100–200 мкг/мл в течение 20–30 мин.

Трансформация штаммов *S. lactis* плазмидами *pRT84* и *pLF2*. Трансформацию осуществляли, как описано в «Материалах и ме-

Образцы электрофоретического разделения ДНК плазмид и их фрагментов рестрикции: 1—ДНК фага λ , обработанная рестриктазой *PstI*; 2, 3—ДНК *pRT84* из *B. subtilis* и *S. lactis* *LMO230 rif^r* соответственно, обработанные *PstI*; 4, 5—то же для ДНК плазмиды *pLF2*; 6, 7—ДНК *pRT84* из *B. subtilis* и *S. lactis* *LMO230 rif^r* соответственно (видны олиго- и мономерные формы); 8, 9—то же для ДНК плазмиды *pLF2*

Patterns of electrophoresis of plasmid DNAs and their restriction fragments from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*: 1—DNA of phage λ digested by *PstI* restrictase; 2—DNA of *pRT84* from *Bacillus subtilis* digested by *PstI*; 3—DNA of *pRT84* from *Streptococcus lactis* *LMO230 rif^r* digested by *PstI*; 4—DNA of *pLF2* from *Bacillus subtilis* digested by *PstI*; 5—DNA of *pLF2* from *Streptococcus lactis* *LMO230 rif^r* digested by *PstI*; 6—DNA of *pRT84* from *Bacillus subtilis* (the monomer and oligomer forms are visible); 7—DNA of *pRT84* from *Streptococcus lactis* *LMO230 rif^r* (the monomer and oligomer forms are visible); 8—DNA of *pLF2* from *Bacillus subtilis* (the monomer and oligomer forms are visible); 9—DNA of *pLF2* from *Streptococcus lactis* *LMO230 rif^r* (the monomer and oligomer forms are visible)



тодах». Было обнаружено, что инкубация сферопластов в жидкой стабилизированной среде М21Г, необходимая для индукции устойчивости к эритромицину, может на порядок снижать титр жизнеспособных клеток. Поэтому при трансформации плазмидой *pRT84* сферопласты, отмытые от ПЭГ, высевали в полужидкой агаризованной среде М21Г на поверхность плотной среды М21Г, содержащей 0,4 мкг/мл эритромицина. В этих условиях наряду с индукцией устойчивости к антибиотикам обеспечивалась хорошая контрелекция реципиентных клеток. Частота трансформантов по отношению к жизнеспособным сферопластам составляла 10^{-4} . При этом на 1 мкг плазмидной ДНК появлялось 10^3 колоний трансформированных бактерий. Трансформанты *S. lactis*, получившие плазмиду *pRT84*, приобретали способность к гидролизу крахмала, что свидетельствует об экспрессии гена α -амилазы *B. amyloliquefaciens* в клетках этих бактерий. При трансформации плазмидой *pLF2* на 1 мкг плазмидной ДНК появлялось приблизительно 10^2 трансформантов.

Присутствие плазмид в клетках трансформированных штаммов *S. lactis* подтверждают результаты электрофоретического исследования препаратов нативных плазмид и их рестриктвов (рисунок).

Первоначально в экспериментах по трансформации использовали плазмидные ДНК, выделенные из клеток соответствующих штаммов *B. subtilis*. Чтобы проверить возможное влияние на этот процесс систем модификации — рестрикции *S. lactis*, плазмиды *pRT84* и *pLF2* выделяли из полученных трансформантов штамма *S. lactis* *LMO230 rif^r* и вновь использовали для трансформации этого же штамма. Частота трансформации при этом не изменилась.

Плазмиды *pRT84* и *pLF2* стабильно поддерживались в клетках *S.*

lactis. Мы проверили по 200 колоний, полученных после рассева культур *S. lactis* (*pRT84*) и *S. lactis* (*pLF2*), выращенных в течение 25 генераций в неселективных условиях. Все они сохранили детерминированную плазмидами устойчивость к соответствующим антибиотикам.

Таким образом, используя полученные с помощью лизоцима сферопласты, нам удалось осуществить эффективную плазмидную трансформацию *S. lactis* и расширить круг плазмид, которые поддерживаются в клетках этих бактерий и могут применяться в экспериментах по молекулярному клонированию.

Авторы благодарят д-ра Л. Л. МэкКэя и В. Ф. Семенихину за предоставленные штаммы.

PLASMID TRANSFORMATION OF STREPTOCOCCUS LACTIS SPHAEROPLASTS.

L. M. Rumer, V. A. Livshits

Institute of Genetics and Selection
of Industrial Microorganisms

Summary

The optimal conditions for production of transformable spheroplasts of *Streptococcus lactis* using lysozyme were determined. It has been established that viability of *Streptococcus lactis* cells fell rapidly when concentration of lysozyme or duration of lysozyme treatment increased.

The successful transformation of *Streptococcus lactis* spheroplasts by two heterologous plasmids *pRT84* and *pLF2* was performed. It was found that expression of *Bacillus amyloliquefaciens* gene coding for amylase cloned in *pRT84* took place in *Streptococcus lactis* cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kondo J. K., McKay L. L. Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA // Appl. Environ. Microbiol.—1982.—43, N 5.— P. 1213—1215.
2. Kondo J. K., McKay L. L. Mutanolysin for improved lysis and rapid protoplast formation in dairy streptococci // J. Dairy Sci.—1982.—65, N 8.— P. 1428—1431.
3. Okamoto T., Fujita Y., Irie R. Fusion of protoplasts of *Streptococcus lactis* // Agr. Biol. Chem.—1983.—47, N 11.— P. 2675—2676.
4. Fujita Y., Okamoto T., Irie R. Protoplast formation and regeneration of *Streptococcus lactis* cells // Ibid.—N 2.— P. 259—263.
5. Kondo J. K., McKay L. L. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: optimization and use in molecular cloning // Appl. Environ. Microbiol.—1984.—48, N 2.— P. 252—259.
6. Aspects of genetic transformation involving protoplasts and purified *lac* plasmid of *Streptococcus lactis* / R. S.-T. Yu, W. S. A. Kyle, A. A. Azad, T. V. Hung // Milchwissenschaft.—1984.—39, N 3.— P. 476—479.
7. Simon D., Rouault A., Chopin M.-C. High-efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA // Appl. Environ. Microbiol.—1986.—52, N 2.— P. 394—395.
8. Kok J., van der Vossen J. M. B. M., Venema G. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* // Ibid.—1984.—48, N 4.— P. 726—731.
9. Gasson M. J. Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci // FEMS Microbiol. Lett.—1980.—9, N 1.— P. 99—102.
10. Woskow S. A., Kondo J. K. Effect of proteolytic enzymes on transfection and transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts // Appl. Environ. Microbiol.—1987.—53, N 10.— P. 2583—2587.
11. Sanders M. E., Nicholson M. A. A method for genetic transformation of nonprotoplasted *Streptococcus lactis* // Ibid.—N 8.— P. 1730—1736.
12. Malke H. Genetic of resistance to macrolide antibiotics and lincomycin in natural isolates of *Streptococcus pyogenes* // Mol. and Gen. Genet.—1974.—135, N 4.— P. 349—367.
13. Интерферон, секретируемый *Bacillus subtilis*, задерживается мембранами / А. С. Аваков, Т. В. Черновская, В. Е. Бидненко и др. // Докл. АН СССР.—1986.—288, № 3.— С. 717—720.

Окончание см. на 3-й странице обложки.