

УДК 579.252.59

**ШТАММЫ *Lysobacter* sp. XL1 И XL2
НЕ СОДЕРЖАТ ПЛАЗМИД***Ю.С. Лантева, О.Э. Золова, А.С. Соколов,
О.А. Степная, И.Э. Грановский***Аннотация**

С использованием двух подходов, метода Экхардта и электрофореза в пульсирующих полях, был проведен анализ штаммов *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 на наличие в них мегаплазмид. Были подобраны оптимальные условия для разделения протяженных молекул геномной ДНК бактерий, как линейных, так и кольцевых, размером от 40 до 1500 т.п.н. На примере штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 было показано, что применение метода электрофореза в пульсирующих полях позволяет добиваться четкого разделения плазмид, определять их размер и количество. Результаты проведенного в обозначенных условиях анализа геномной ДНК бактерий *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 указывают на отсутствие плазмид в клетках данных штаммов.

Ключевые слова: мегаплазмиды, метод Экхардта, электрофорез в пульсирующих полях, *Lysobacter* species.

Введение

Плазмиды являются внехромосомными элементами наследственности, которые стабильно наследуются внутри бактериальной линии клеток [1]. Криптические плазмиды не проявляют себя на фенотипическом уровне, но часто содержат генетические детерминанты, обеспечивающие своим хозяевам ряд адаптивных преимуществ [2]. К ним, например, относятся гены устойчивости к различным антибиотикам, бактериоцинам, токсинам, бактериофагам [3], гены деградации сложных органических соединений, гены фиксации молекулярного азота и образования клубеньков у симбиотических бактерий [4]. Гены вирулентности фитопатогенных бактерий, так называемые «островки патогенности», также имеют плазмидную локализацию [5]. Плазмиды принадлежат к определенным группам несовместимости, что определяет круг их бактериальных хозяев, а также возможность сосуществования различных плазмид и, как следствие, возможность совмещения различных признаков в отдельно взятом штамме. Мобильные элементы в составе бактериального генома могут обеспечивать внутриклеточный перенос ассоциированных с ними последовательностей не только с плазмиды в хромосомную ДНК и с хромосомной ДНК на плазмиду, но и между двумя плазмидами, находящимися в одной клетке [6]. Горизонтальный перенос плазмид между штаммами, видами и родами обеспечивает широкое распространение данных признаков в бактериальных популяциях и играет ключевую роль в эволюции и адаптации микробных сообществ [2]. Поиск и изучение плазмид имеет

огромное фундаментальное и прикладное значение. Наличие или отсутствие плазмид является одной из важных характеристик при анализе генома бактерии.

Штамм *Lysobacter* sp. XL1 секретирует в окружающую среду ряд литических ферментов с различной субстратной специфичностью [7]. Гены двух ферментов – литических эндопептидаз Л1 и Л5 – к настоящему моменту нами клонированы и определена их первичная нуклеотидная последовательность [8, 9]. С 1965 года интенсивно изучаются литические ферменты представителей рода *Lysobacter*, однако к настоящему моменту в базе данных NCBI [10] нет ни одного представителя этого рода, для которого был бы секвенирован геном. При анализе литературных данных нам также не удалось найти каких-либо работ по идентификации плазмид в бактериях рода *Lysobacter*. Определение плазмидного статуса штамма *Lysobacter* sp. XL1 важно как для фундаментальной науки, так и для биотехнологии. Показано, что при длительном культивировании в условиях продукции литических ферментов происходит снижение бактериолитической активности штамма *Lysobacter* sp. XL1 из-за накопления в популяции малоактивного штамма, названного *Lysobacter* sp. XL2. Для него характерны повышенная скорость роста и нарушение продукции некоторых ферментов, в частности литических эндопептидаз Л1, Л4 и Л5 [11]. Вопрос о том, как и почему происходит трансформация активных клеток в малоактивные, не изучен. Основную роль в диссоциативных переходах бактерий отводят мобильным генетическим элементам: плазмидам, транспозонам, интегронам и умеренным бактериофагам, которые участвуют в регуляции экспрессии генов и индукции геномных перестроек [3, 12–14]. Известно, что гены протеаз, в том числе литических, могут иметь как хромосомную, так и плазмидную локализацию. Показано, например, что ген, кодирующий Gly–Gly-эндопептидазу (ЕС 3.4.99.17) *Staphylococcus simulans*, локализуется на плазмиде размером 40 т.п.н. [15]. Гены, кодирующие сложную систему протеолитических ферментов бактерии *Lactococcus lactis*, в основном располагаются на плазмидах [16, 17]. Появление малоактивной формы *Lysobacter* sp. XL2 можно было бы объяснить утратой частью популяции клеток плазмидной ДНК. Таким образом, цель настоящей работы заключалась в анализе генома бактерии *Lysobacter* sp. XL1 на присутствие плазмид и возможной локализации на них генов литических ферментов.

1. Методы исследования

1.1. Штаммы бактерий и условия культивирования. В работе использовали штаммы *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 из коллекции лаборатории биохимии клеточной поверхности ИБФМ РАН. Клетки *Lysobacter* sp. растили при 28 °С на среде LB (1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, pH 7.5) до оптической плотности $OD_{590} = 0.4–0.5$ ($\sim 5 \cdot 10^8$ клеток/мл).

Штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 [4] был любезно предоставлен Т.В. Ивашиной. Выращивание клеток *R. l. bv. viciae* VF39 проводили при 28 °С на среде TY (0.5% триптон, 0.3% дрожжевой экстракт, 0.092% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, pH 6.8 [18]) до оптической плотности $OD_{590} = 0.6–0.7$ ($\sim 1 \cdot 10^8$ клеток/мл).

Штамм *E. coli* MG1655 ($F^- \lambda^- ilvG^- rfb^- 50 rph^- 1$) [19] выращивали при 37 °С на среде LB до оптической плотности $OD_{590} = 0.5–0.6$ ($\sim 1.5 \cdot 10^8$ клеток/мл).

1.2. Детекция плазмид в клетках по модифицированному методу Экхардта. Детекцию плазмид в бактериях проводили по методу Экхардта с некоторыми модификациями [20]. 0.5–3 мл клеток бактерий, выращенных, как описано выше, осаждали центрифугированием, суспендировали в 85 мкл раствора I (20% фикол, $1 \times$ ТБЭ), прогревали в течение 10–15 мин при 45 °С. В лунки вертикального 0.7% агарозного геля, содержащего $1 \times$ ТБЭ и 0.1% ДДС-На, последовательно наносили по 10 мкл лизирующего буфера (30% фикол, $1 \times$ ТБЭ, 0.04% БФС, 50 мкг/мл РНКазы А и лизоцим 50 мкг/мл) и клеточной суспензии. Инкубировали в течение 10 мин и поверх слоя клеток наносили 30 мкл раствора II (0.2% ДДС-На, 10% фикол, $1 \times$ ТБЭ) и 50 мкл раствора III (0.2% ДДС-На, 5% фикол, $1 \times$ ТБЭ). Лунки заплавляли теплой агарозой (55–65 °С) и проводили электрофорез в течение 60 мин при напряженности электрического поля 2 В/см при комнатной температуре, затем в течение 10 ч при 4 В/см при 8 °С. После проведения электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 10 мин, затем отмывали дистиллированной водой в течение 20 мин и фотографировали в проходящем ультрафиолете.

1.3. Разделение молекул ДНК методом электрофореза в пульсирующих полях. Для электрофореза в пульсирующих полях блок-вставки с интактной ДНК бактерий получали, как описано в [21]. Агарозные блок-вставки готовили с разным количеством клеток. Для этого соответствующий объем культуры, выращенной, как описано выше, осаждали центрифугированием при $5000 \times g$ в течение 10 мин при 4 °С, суспендировали в 0.5 мл Pett IV-буфера (10 мМ Трис-НСI, pH 7.5; 1 М NaCl), смешивали с равным объемом 2% легкоплавкой агарозы при 42 °С и разливали по 150 мкл в формочки размером $20 \times 10 \times 1$ мм. Охлаждали формочки при 4 °С в течение 20 мин. Блок-вставки помещали в равный объем лизирующего буфера ЕС (6 мМ Трис-НСI pH 7.5; 1 М NaCl; 100 мМ ЭДТА, pH 8.0; 0.5% Бридж – 58; 0.2% дезоксихалат натрия; 0.5% лаурил саркозил) и обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) и РНКазой (20 мкг/мл) в течение ночи при 37 °С. Затем блок-вставки инкубировали в равном объеме ESP буфера (0.5 М ЭДТА pH 9.0; 1% лаурил саркозил и 1 мг/мл протеиназы К) при 50 °С в течение 48 ч. Блок-вставки отмывали четыре раза по 2 ч в промывочном буфере (10 мМ Трис-НСI, 50 мМ ЭДТА pH 8.0). При второй и третьей отмывке добавляли ФМСФ (до 1 мМ). Полученные таким образом блок-вставки хранили в 0.5 М ЭДТА pH 8.0 в течение года. Обычная нагрузка при фореze – 1/4–1/8 блок-вставки на дорожку.

Реакцию гидролиза ДНК в блок-вставках проводили при 37 °С в течение 4 ч хоминг-эндонуклеазой I-SceI из расчета 5 ед. акт. фермента на 1/2 блок-вставки.

Электрофорез в пульсирующих полях проводили с использованием гексагонального электрода на аппарате фирмы Pharmacia-LKB в условиях, рекомендуемых фирмой-производителем. Разделение фрагментов ДНК проводили в 1% агарозном геле, $0.5 \times$ ТБЭ буфере при температуре 14 °С. Молекулы ДНК размером до 700 т.п.н. разделяли в режиме линейного увеличения времени пульса от 50 до 90 с в течение 36 ч при напряженности электрического поля 4.16 В/см. Молекулы ДНК размером более 500 т.п.н. разделяли при постоянном времени пульса 110 с в течение 36 ч при напряженности электрического поля 4.5 В/см.

После проведения электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 10 мин, затем отмывали дистиллированной водой в течение 20 мин и фотографировали в проходящем ультрафиолете.

2. Результаты и обсуждение

Известно, что плазмиды бактерий варьируют в широком диапазоне размеров – от 0.9 [22] до 1800 т.п.н. [23]. Высокомолекулярная ДНК очень чувствительна к сдвиговым усилиям и фрагментируется при выделении. Поэтому препараты интактной ДНК размером более чем 30–40 т.п.н. невозможно получить с использованием традиционных методов выделения. В 70-е годы XX в. Томасом Экхардтом была разработана методика для быстрой идентификации плазмидной ДНК в бактериях [20]. Методика, получившая к настоящему времени широкое распространение и множество модификаций, достаточно проста, не требует сложного оборудования и позволяет быстро оценивать количество и примерный размер плазмид в клетках. Из данных литературы известно, что в геноме бактерии *R. l. bv. viciae* VF39 присутствует шесть мегаплазмид размером 900, 700, 500, 400, 220 и 150 т.п.н. [4, 24]. Поэтому данный штамм использовался нами в качестве контрольного штамма для подбора оптимальных условий разделения кольцевых молекул ДНК с установленным размером.

2.1. Детекция плазмид в клетках по модифицированному методу Экхардта. При проведении скрининга методом Экхардта мы использовали различную нагрузку ДНК на лунку, то есть вносили в лунки геля различное количество клеток исследуемых культур *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2. В ходе многократно повторенных экспериментов мы всегда наблюдали присутствие плазмид в штамме *R. l. bv. viciae* VF39 (рис. 1), тогда как в случае штамма *Lysobacter* sp. XL1 детектировать плазмидную ДНК нам не удавалось. В единичном эксперименте, повторное воспроизведение которого не удалось, мы детектировали полосу, похожую на плазмидную ДНК (рис. 1, а, дорожка 1) размером более 900 т.п.н. Подобные результаты можно объяснить тем, что используемый метод очень чувствителен к количеству клеток, возрасту культуры и аккуратности нанесения образцов, так как мегаплазмиды, в отличие от плазмид средних размеров, более чувствительны к действию нуклеаз и технике выполнения метода. Поскольку результаты, полученные с использованием метода Экхардта, не позволяли однозначно судить о присутствии мегаплазмид в клетках бактерии *Lysobacter* sp. XL1 и XL2, мы провели анализ геномной ДНК бактерий с использованием электрофореза в пульсирующих полях.

2.2. Разделение молекул ДНК методом электрофореза в пульсирующих полях. Электрофорез в пульсирующих полях позволяет разделять фрагменты ДНК размером от $0.2 \cdot 10^6$ до $10 \cdot 10^6$ п.н. без их повреждения от сил сдвига. Разделить высокомолекулярные молекулы ДНК с использованием электрофореза впервые удалось в начале 80-х годов прошлого века Шварцу с соавторами [25]. Для получения интактной ДНК хромосом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* размером 200–2200 т.п.н. авторы заплавляли клетки в легкоплавкую агарозу. В настоящий момент существует ряд вариантов исполнения данного метода,

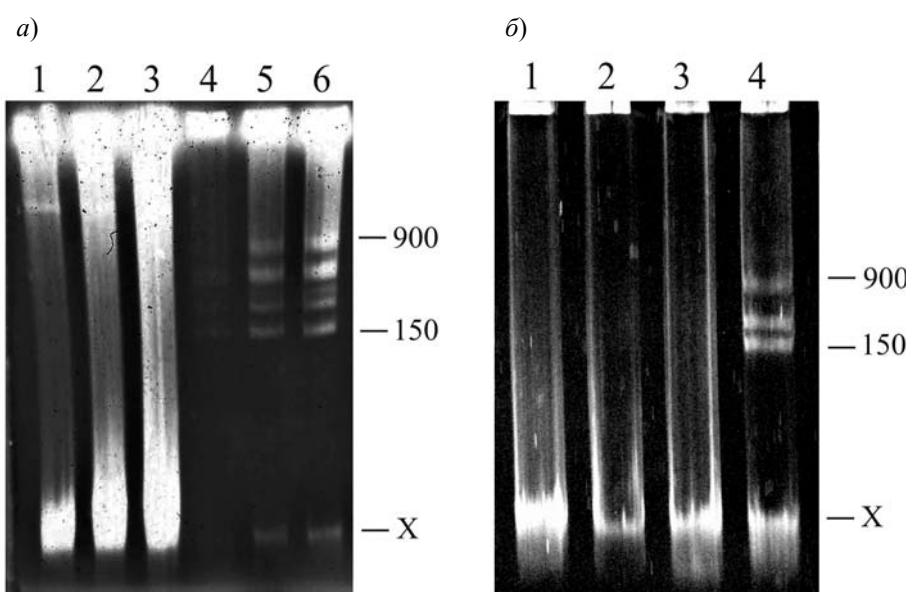


Рис. 1. Анализ плазмидного профиля бактерий модифицированным методом Экхардта. а) Нагрузка на дорожки: *Lysobacter* sp. XL1 – $5 \cdot 10^8$ (1), $1 \cdot 10^9$ (2) и $3 \cdot 10^9$ (3) клеток; *R. l. bv. viciae* VF39 – $1 \cdot 10^8$ (4), $2 \cdot 10^8$ (5) и $4 \cdot 10^8$ (6) клеток. б) *Lysobacter* sp. XL1 – $2 \cdot 10^8$ (1) и $5 \cdot 10^7$ (2) клеток; *Lysobacter* sp. XL2 – $1 \cdot 10^8$ клеток (3); *R. l. bv. viciae* VF39 – $5 \cdot 10^8$ клеток (4). Справа от каждого рисунка указаны размеры плазмид в т.п.н, X – хромосомная ДНК

широкая приборная база [26] и рекомендованные фирмой-производителем условия для разделения молекул ДНК. Однако для каждого конкретного случая необходимо оптимизировать сочетание таких параметров, как время пульса, напряженность поля, концентрация агарозы, состав и температура буфера и общее время проведения электрофореза.

В настоящей работе мы провели оптимизацию рекомендованных для прибора Pharmacia-LKB условий путем варьирования таких параметров, как время пульса, напряженность поля и время проведения пульс-электрофореза (см. п. 1.3), и затем провели анализ штаммов.

На первом этапе работы мы определяли количество клеток и оптимальные условия, необходимые для визуализации всех шести плазмид контрольного штамма *R. l. bv. viciae* VF39. Для этого мы получили блок-вставки с разным количеством клеток (см. п. 1.3). Разделение плазмидной ДНК *R. l. bv. viciae* VF39 при помощи пульс-электрофореза проводили в режиме линейного увеличения времени пульса от 50 до 90 с в течение 36 ч. В результате экспериментально было установлено, что нагрузка от $2 \cdot 10^6$ до $5 \cdot 10^7$ клеток на дорожку дает практически одинаковый результат (рис. 2) и данный режим позволяет эффективно разделять молекулы плазмидной ДНК размером от 140 до 700 т.п.н.

Известно, что плазмиды в клетках бактерий бывают не только кольцевыми, но и линейными [23, 27]. Поскольку при электрофорезе подвижность линейных молекул отличается от подвижности кольцевых молекул, то для анализа разделения протяженных линейных молекул ДНК мы гидролизовали хромосому *E. coli* MG1655 хоминг-эндонуклеазой I-CeuI. Сайт гидролиза I-CeuI располагается в кластере генов 23S рибосомальной РНК [28, 29], количество которых в *E. coli*

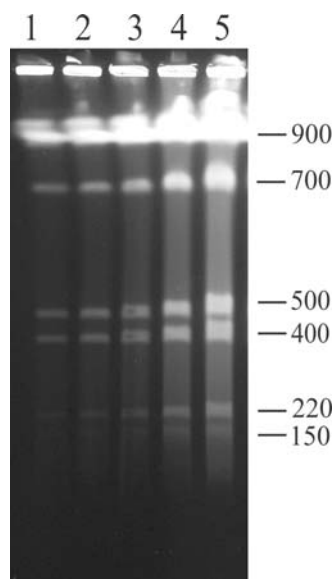


Рис. 2. Разделение плазмид *R. l. bv. viciae* VF39 электрофорезом в пульсирующих полях. Нагрузка на дорожки: 1 – $2 \cdot 10^6$, 2 – $4 \cdot 10^6$, 3 – $1 \cdot 10^7$, 4 – $2 \cdot 10^7$ и 5 – $5 \cdot 10^7$ клеток. Электрофорез проводили в режиме возрастания времени пульса от 50 до 90 с в течение 36 ч при напряженности электрического поля 4.16 В/см. Слева и справа указаны размеры молекул ДНК в т.п.н.

составляет семь [30]. На основании известной нуклеотидной последовательности генома штамма MG1655 мы рассчитали размеры фрагментов ДНК, образующихся при гидролизе: 1500, 700, 620, 520, 130, 100 и 40 т.п.н.

Результаты разделения геномной ДНК *Lysobacter* sp. XL1 и XL2, *E. coli* MG1655 и *R. l. bv. viciae* VF39 в режиме увеличения импульса с 50 до 90 с представлены на рис. 3. Показано, что при данном режиме происходит эффективное разделение линейных молекул и плазмидной ДНК размером от 40 до 700 т.п.н. Молекулы ДНК большего размера локализируются в зоне компрессии – области верхней части геля, где движутся молекулы ДНК, которые не разделяются при данных условиях. Как видно из рисунка, плазмид размером до 700 т.п.н. в штаммах нет, но нельзя однозначно сказать что находится в зоне компрессии.

Известно, что чем больше размер разделяемых фрагментов ДНК, тем реже следует производить переключение полей [26]. Поэтому для разделения молекул ДНК большего размера мы увеличили продолжительность времени пульса. Электрофорез проводили в режиме постоянного времени пульса 110 с в течение 36 ч (рис. 4). Показано, что данный режим позволяет достаточно четко разделять кольцевые молекулы плазмидной ДНК размером от 220 до 900 т.п.н. и выше, а также линейные фрагменты размером от 700 до 1500 т.п.н. При таких условиях разделения в зоне компрессии оказываются молекулы от 1500 до 2000 т.п.н. Как видно из рис. 4, обе зоны не содержат каких-либо полос. Проведенный с использованием вышеуказанных режимов анализ геномной ДНК *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 не выявил наличие плазмид в этих штаммах, по крайней мере размером менее 2000 т.п.н.

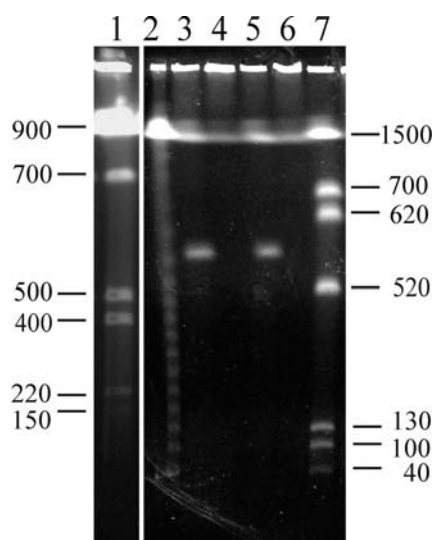


Рис. 3. Разделение молекул ДНК бактерий электрофорезом в пульсирующих полях. Дорожки: 1 – *R. l. bv. viciae* VF39 ($1 \cdot 10^7$ клеток); 2 – конкатамеры λ (Bio-Rad); 3 и 4 – *Lysobacter* sp. XL1 ($1 \cdot 10^7$ клеток); 5 и 6 – *Lysobacter* sp. XL2 ($1 \cdot 10^7$ клеток); 7 – *E. coli* MG1655 ($2 \cdot 10^7$ клеток). 1, 2, 4 и 6 – интактная ДНК; 3, 5 и 7 – ДНК, гидролизованная хоминг-эндонуклеазой I-CeuI. Электрофорез проводили в режиме возрастания времени пульса от 50 до 90 с в течение 36 ч при напряженности электрического поля 4.16 В/см. Слева и справа указаны размеры молекул ДНК в т.п.н.

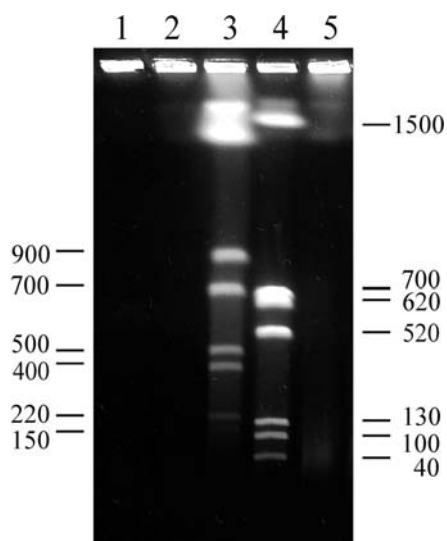


Рис. 4. Разделение молекул ДНК бактерий электрофорезом в пульсирующих полях. Дорожки: 1 – *Lysobacter* sp. XL1 ($1 \cdot 10^7$ клеток); 2 – *Lysobacter* sp. XL1 ($2 \cdot 10^7$ клеток); 3 – *R. l. bv. viciae* VF39 ($4 \cdot 10^6$ клеток), 4 – *E. coli* MG1655 ($2 \cdot 10^7$ клеток), гидролизованная хоминг-эндонуклеазой I-CeuI, 5 – *Lysobacter* sp. XL1 ($2 \cdot 10^8$ клеток)

Заключение

В работе впервые проведен анализ бактерии рода *Lysobacter* на присутствие в ее геноме плазмид. Результаты анализа суммарной ДНК *Lysobacter* sp. XL1 и XL2, полученные при помощи методов Экхардта и пульс-электрофореза, позволяют нам сделать вывод об отсутствии мегаплазмид в исследуемых штаммах. Таким образом, гены литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 локализованы в хромосоме, а вопрос о причинах появления в популяции *Lysobacter* sp. XL1 малоактивных клеток остается открытым. Полученные результаты и отработанные методики дают предпосылки для дальнейших исследований данных штаммов.

Авторы статьи выражают огромную благодарность Татьяне Владимировне Ивашиной за консультацию, ценные советы и помощь в проведении настоящей работы.

Summary

Yu.S. Lapteva, O.E. Zolova, A.S. Sokolov, O.A. Stepnaya, I.E. Granovskii. Lysobacter sp. Strains XL1 and XL2 Do Not Contain Plasmids.

Lysobacter sp. strains XL1 and XL2 were analyzed for the presence of megaplasmids by the Eckhardt technique and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The Eckhardt technique yielded irreproducible results, failing to indicate unambiguously the occurrence of megaplasmids in the strains. The alternative technique, PFGE, enabled conditions for resolving linear and circular DNA molecules ranging from 40 up to 1500 kb. Using the strain *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 as an example, PFGE in contrast with the Eckhardt technique was shown to be more convenient for separation of plasmid DNA molecules and their number/size determination. Analysis of genomic DNA in *Lysobacter* sp. XL1 and XL2 under above conditions revealed the absence of plasmids in these strains.

Key words: megaplasmids, Eckhardt technique, pulsed-field gel electrophoresis, *Lysobacter* species.

Литература

1. Lederberg J. Cell genetics and hereditary symbiosis // *Physiol. Rev.* – 1952. – V. 32, No 4. – P. 403–430.
2. Top E.M., Moenne-Loccoz Y., Pembroke T. Phenotypic traits conferred by plasmids // Thomas C.M. (ed.) *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread.* – Amsterdam: Harwood Acad. Publ., 2000. – 444 p.
3. Vivian A., Murillo J., Jackson R.W. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? // *Microbiology.* – 2001– V. 147. – P. 763–780.
4. Hynes M.F., McGregor N.F. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum* // *Mol. Microbiol.* – 1990. – V. 4, No 4. – P. 567–574.
5. Lee C. Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens // *Infect. Agents. Dis.* – 1996. – V. 5, No 1. – P. 1–7.
6. Zhang X., Kosier B., Priefer U.B. Symbiotic Plasmid Rearrangement in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183, No 6. – P. 2141–2144.
7. Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты // *Усп. биол. химии.* – 1999. – Т. 39. – С. 327–354.

8. Пат. 2407782 Российская Федерация. Литическая протеаза AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XL1, фрагмент ДНК, кодирующий литическую протеазу AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XL1, и способ получения литической протеазы AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XL1 / И.Э. Грановский, А.Е. Калинин, Ю.С. Лаптева, О.Р. Латыпов, Н.В. Васильева, И.М. Цфасман, О.А. Степная, И.С. Кулаев, Т.А. Муранова, Л.А. Краковская – № 2009105828/10, заявл. 20.02.09, опубл. 27.12.10, Бюл. № 36. – 16 с.
9. Пат. 2408725 Российская Федерация. Литическая протеаза AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1, фрагмент ДНК, кодирующий литическую протеазу AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1, и способ получения литической протеазы AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1 / И.Э. Грановский, А.Е. Калинин, Ю.С. Лаптева, О.Р. Латыпов, Н.В. Васильева, И.М. Цфасман, О.А. Степная, И.С. Кулаев, Т.А. Муранова, Л.А. Краковская. – № 2009105830/10, заявл. 20.02.09, опубл. 10.01.11, Бюл. № 1. – 15 с.
10. The National Center for Biotechnology Information. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>, свободный.
11. Степная О.А., Цфасман И.М., Ледова Л.А., Петрикевич С.Б., Бегунова Е.А., Кулаев И.С. Сравнение состава комплекса бактериолитических ферментов бактерии *Xanthomonas* sp. – продуцента бактериолитического ферментного препарата лизоамидаза – и ее малоактивной формы // Микробиол. – 1996. – Т. 65, Вып. 3. – С. 339–344.
12. Rivas L.A., Mansfield J., Tsiamis G., Jackson R.W., Murillo J. Changes in race-specific virulence in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola are associated with a chimeric transposable element and rare deletion events in a plasmid-borne Pathogenicity Island // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 3778–3785.
13. Gillings M.R., Holley M.P., Stokes H.W., Holmes A.J. Integrons in *Xanthomonas*: A source of species genome diversity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102, No 12. – P. 4419–4424.
14. Khan A.A., Ponce E., Nawaz M.S., Cheng Ch.-M., Khan J.A., West Ch.S. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from imported seafood // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75, No 4. – P. 1192–1196.
15. Recsei P.A., Gruss A.D., Novick R.P. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – V. 84, No 5. – P. 1127–1131.
16. Kok J., Van Dijl J.M., Van Der Vossen J., Venema G. Cloning and expression of a *Streptococcus cremoris* proteinase in *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis* // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – V. 50, No 1. – P. 94–101.
17. Kok J., Leenhouts K.J., Haandrikman A.J., Ledebøer A.M., Venema G. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2 // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – V. 54, No 1. – P. 231–238.
18. Beringer J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* // J. Gen. Microbiol. – 1974. – V. 84, No 1. – P. 188–198.
19. Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // Science. – 1997. – V. 277, No 5331. – P. 1453–1474.
20. Eckhardt T.A. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria // Plasmid J. – 1978. – V. 1, No 4. – P. 584–588.
21. Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дейвиса. – М.: Мир, 1990. – 246 с.
22. Zhaxybayeva O., Swithers K.S., Lapierre P., Fournier G.P., Bickhart D.M., DeBoy R.T., Nelson K.E., Nesbø C.L., Doolittle W.F., Gogarten J.P., Noll K.M. On the chimeric na-

- ture, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – V. 106, No 14. – P. 5865–5870.
23. Medema M.H., Trefzer A., Kovalchuk A., Berg M., Muller U., Heijne W., Wu L., Alam M.T., Ronning C.M., Niernan W.C., Bovenberg R.A.L., Breitling R., Takano E. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways // Genome Biol. Evol. – 2010. – V. 2. – P. 212–224.
24. Xiong J., Hynes M.F., Ye H., Chen H., Yang Y., M'zali F., Hawkey P.M. bla(IMP-9) and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – V. 50, No 1. – P. 355–358.
25. Schwartz D.C., Cantor C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis // Cell. – 1984. – V. 37, No 1. – P. 67–75.
26. Насонова Е.С. Пульс-электрофорез: теория метода, инструментальный арсенал и области применения // Цитология. – 2008. – Т. 50, Вып. 11. – С. 927–935.
27. König C., Eulberg D., Gröning J., Lakner S., Seibert V., Kaschabek S.R., Schlömann M. A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP // Microbiology. – 2004. – V. 150, No 9. – P. 3075–3087.
28. Toda T., Itaya M. I-CeuI recognition sites in the *rrn* operons of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome: inherent landmarks for genome analysis // Microbiology. – 1995. – V. 141, No 8. – P. 1937–1945.
29. Newnham E., Chang N., Taylor D.E. Expanded genomic map of *Campylobacter jejuni* UA580 and localization of 23S ribosomal rRNA genes by I-CeuI restriction endonuclease digestion // FEMS Microbiol. Lett. – 1996. – V. 142, No 2–3. – P. 223–229.
30. Liu S.L., Hessel A., Sanderson K.E. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 90, No 14. – P. 6874–6878.

Поступила в редакцию
14.03.11

Лаптева Юлия Сергеевна – научный сотрудник Института биологического при-
боростроения с опытным производством РАН, г. Пущино.

E-mail: lapteva-julia@rambler.ru

Золова Ольга Эдуардовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник
Института наук о жизни Университета Мичигана, США.

E-mail: ozolova@umich.edu

Соколов Андрей Сергеевич – сотрудник компании «Мепротек», г. Пущино.

E-mail: 212sok@rambler.ru

Степная Ольга Андреевна – кандидат биологических наук, старший научный со-
трудник Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино.

E-mail: stepnaya@ibpm.pushchino.ru

Грановский Игорь Эдуардович – кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино.

E-mail: granovsky@ibpm.pushchino.ru