

ЛУК'ЯНЧУК В.В.✉, ПОЛІЩУК Л.В.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,  
Україна, Д03680, Київ МСП, вул. Заболотного, 154

✉ LVPolishchuk@ukr.net

### КЛОНУВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТІ ГОМОЛОГІЧНОГО crt-КЛАСТЕРА В *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-бп

**Мета.** Встановити вплив додаткового гомологічного crt-кластера на каротиногенез у клітинах реципієнтного стрептоміцету. **Методи.** З цією метою було проведено трансформацію гібридною плазмідною рWC 9,6. Плазмідною рWC 9,6, що містила фрагмент послідовності crt-кластера (9576 п. н.) Crt<sup>+</sup>-мутанту *S. globisporus* Crt4, трансформували клітини Crt<sup>-</sup>-реципієнта *S. globisporus* 1912-бп. Для побудови гібридної плазмиди фрагменти отриманих ПЛР-копій послідовності crt-кластера мутанта Crt4 клонували в складі човникового вектора рWHM4 (6,6 т. п. н.). Клонування провели за унікальними сайтами рестрикції ендонуклеаз XbaI та HindIII, що знаходяться в полілінкері вектора. Дані рестриктази не мають сайтів рестрикції на послідовності crt-кластера. **Результати.** Сконструйовано гібридну плазмиду рWC 9,6 (16,2 т. п. н.), яка містить послідовність crt-кластера Crt<sup>+</sup>-мутанту Crt4 (9576 п. н.). Ця плазмидна успішно функціонує в клітинах обох реципієнтів (*E. coli* XL1 Blue і *S. globisporus* 1912-бп) – надає їм стійкості до відповідних антибіотиків. Плазмидна рWC 9,6 стабільно зберігає свій молекулярний розмір (16,2 т. п. н.). Однак безперечних доказів експресії crt-кластерів у стрептоміцетних трансформантів не виявлено. **Висновки.** Сконструйовано плазмиду рWC 9,6, що трансформує та стабільно функціонує в клітинах обох реципієнтів (стрептоміцета і *E. coli*).

**Ключові слова:** crt-кластер, човниковий вектор, клонування, резистентність, ПЛР.

Синтез каротиноїдів та їх регуляція всебічно досліджені у багатьох стрептоміцетів з клади *Streptomyces griseus* (*S. griseus*, *S. hrysomallus*, *S. mediolani*, *S. setonii*, *S. globisporus* та ряд інших) [1–8]. У них встановлено організацію crt-кластерів, індукцію каротиногенезу рядом стрес-факторів (наприклад, протопластування) [2]. Виявлено ряд штамів (як виділені з навколишнього середовища, так і отримані ек-

периментально) *S. griseus* клади, у яких синтез каротину здійснюється конститутивно: *S. chrysomallus* var. *carotenoides*, *S. globisporus* 1912 Crt4, *S. mediolani* 2215174 FI, *S. setonii* (*griseus*) ISP5395) [1–4].

Дослідження каротиногенезу у стрептоміцетів проводиться з використанням як традиційних генетичних, мікробіологічних, фізико-хімічних методів, так і новітніх, генно-інженерних (як приклад клонування). Таке всебічне вивчення дозволило встановити як шляхи синтезу каротиноїдів, так і організацію crt-кластерів [7, 8].

Метою роботи було дослідити вплив додаткового crt-кластера на каротиногенез у клітинах реципієнтного стрептоміцету. Для цього проводили гомологічне клонування crt-кластера з хромосоми Crt<sup>+</sup>-мутанту *S. globisporus* Crt4 в Crt<sup>-</sup>-реципієнті *S. globisporus* 1912-бп.

#### Матеріали і методи

Виконуючи роботу, використовувалися 2 варіанти wild type штаму стрептоміцета *S. globisporus* 1912 (*S. globisporus* 1912-бп (Crt<sup>-</sup> LndE<sup>-</sup> Spo<sup>+</sup>) [9, 10] і *S. globisporus* Crt4) (Crt<sup>+</sup> LndE<sup>+</sup> Spo<sup>-</sup>) [11, 12] та штам *Escherichia coli* XL1 Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [Fr proAB lacIq ZAM15 Tn10 (Tetr)]) [13]. Біфункціональний вектор рWHM4 (6,6 т. п. н.) використовували за конструювання гібридних плазмід [14].

У роботі використовували середовища: соєве, середовище Оканіші (рідкий та агаризований варіанти), МПА та МПБ [15, 16]. Селекцію трансформантів кишкової палички проводили на середовищах, у які додавали антибіотики (ампіцилін (Ap – 100 мкг/мл) та тетрациклін (Tet – 15 мкг/мл)). Під час відбору стрептоміцетних трансформантів у середовища додавали тіострептон (Th) відповідно до рекомендацій [14, 17].

Хромосомну ДНК з міцелію *S. globisporus*

Crt4 отримували, використовуючи рекомендації Маніатіса і співавторів [18]. Гідроліз та лігування фрагментів ДНК проводили згідно з рекомендаціями тієї ж збірки методик [18], використовуючи ферменти та буфери фірми MBI «Fermentas» (Литва) [13].

Компетентні клітини *Escherichia coli* XL1 Blue отримували, трансформували та відбирали Ar<sup>R</sup>Tet<sup>R</sup>-трансформанти за класичними методами [13, 16]. За клонування гібридних плазмід протопласти варіанта *S. globisporus* 1912-бп отримували, трансформували та відбирали Th<sup>R</sup>-трансформанти відповідно до методики [2, 13, 16].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням ампліфікатора Mastercycler personal («Eppendorf», Німеччина). Застосований режим ПЛР: I етап: 95°C – 60’’; II етап: 30 циклів з чергуванням 94°C – 20’’; 55°C – 30’’; 55°C – 250’’; III етап: 72°C – 45’’; збереження за 4°C. Реакційна суміш містила: 10 mM TrisHCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 одиниця Taq-полімерази, 30 pM праймера, 10 мкл ДНК. Суміш нуклеотидів і Taq-полімеразу використовували від фірми MBI «Fermentas» (Литва). Послідовності праймерів наведені в таблиці.

Плазмідну ДНК з трансформантів виділяли за методом Кізера [19]. Електрофоретичне розподілення ампліконів crt-кластера, плазмід та продуктів їх гідролізу ендонуклеазами II типу

проводили у 0,8 % агарозному гелі. Для визначення молекулярної маси отриманих ПЦР-копій crt-кластера та рестриктів гібридних плазмід використовували HindIII-фрагменти ДНК фагу лямбда як маркер молекулярного розміру.

### Результати та обговорення

Одним із методів дослідження каротиногенезу у стрептоміцетів та його регуляції є клонування послідовностей як всього crt-кластера, так і окремих crt-генів. Як результат ряду таких експериментів отримали каротинсинтезуючі трансформанти (Crt<sup>+</sup>). В інших випадках експресії клонуваних генів не виявляли [7].

На основі інформації про нуклеотидну послідовність crt-кластера штаму *S. globisporus* 1912 (ідентифікаційний номер KM349312.1 в базі GenBank) було підбрано олігонуклеотидні праймери (табл.) для ПЛР. Клонування отриманих ПЛР-копій послідовності crt-кластера (9576 п. н.) каротинсинтезуючого варіанта Crt4 штаму *S. globisporus* 1912 (рис. 1) в складі човникового вектора pWHM4 було проведено за унікальним й сайтами рестрикції для XbaI та HindIII, що знаходяться в полілінкерних фрагментах векторних молекул і не мають сайтів рестрикції на послідовності crt-кластера.

До складу прямого праймера входить послідовність сайту пізнавання для ендонуклеази HindIII, а до складу зворотного праймера – сайт для рестриктази XbaI (табл.).

Таблиця. Послідовності праймерів, що були використані в роботі

Нуклеотидна будова праймерів (5'- 3')	праймер	Нумерація по KM349312.1, п.н.
TTTAAAGCTTCGCAGAGCCGTTCCAGGCTCC*	прямий	1 - 22
TTTTTCTAGAGGGTCTCATCAGGGAGAAATAC**	зворотній	9553 - 9576

Примітки: підкреслено сайти рестрикції ендонуклеаз II типу: \* – HindIII, \*\* – XbaI).

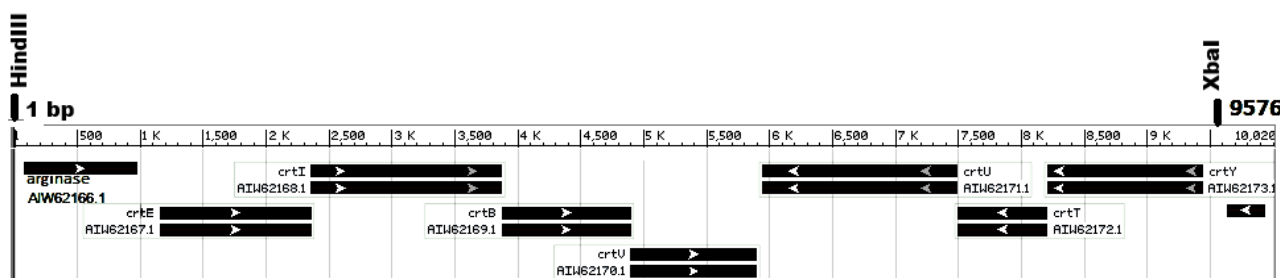


Рис. 1. Організація crt-кластера *S. globisporus* 1912 (KM349312.1). Зазначено розташування сайтів рестрикції для ендонуклеаз XbaI та HindIII.

ПЛР-продукти, отримані за допомогою ПЛР на цільовому фрагменті, досліджували електрофоретичним розподіленням в агарозному гелі. Було отримано ПЛР-амплікони молекулярним розміром 9576 п. н. Довжину було вираховано, базуючись на інформації про первинну структуру *crt*-кластера штаму *S. globisporus* 1912 (KM349312.1) та підтверджено даними електрофоретичного розподілу ПЛР-продуктів.

ДНК ПЛР-ампліконів і векторних плазмід обробляли ендонуклеазами II типу *Xba*I і *Hind*III та проводили спільне лігування отриманих рестриктів (рис. 2). Лігуючою сумішшю трансформували компетентні клітини кишкової палички. Відбирали трансформанти, стійкі до ампіциліну ( $Ap^R$ ) та тетрацикліну ( $Tet^R$ ). Стійкість до тетрацикліну детермінується хромосомою реципієнта. Стійкість до ампіциліну забезпечується геном вектора.

Виділені з  $Ap^R Tet^R$ -трансформантів гібридні плазмідні ДНК (pWC 9,6) мали молекулярний розмір 16,2 т. п. н. (відповідно до векторів клонування pWHM4). Електрофорез продуктів гідролізу ендонуклеазами *Xba*I та *Hind*III плазмідних ДНК ряду  $Ap^R Tet^R$ -трансформантів підтвердив наявність клонованої послідовності з молекулярним розміром 9,6 т. п. н.

Гібридними плазмідами pWC 9,6, виділеними з трансформантів кишкової палички трансформували протопласти безплазмідного варіанта *S. globisporus* 1912 та відбирали трансформанти, стійкі до тіострептому ( $Th^R$ ). Рестрикційний аналіз (ендонуклеазами *Xba*I, *Hind*III і *Eco*RV) плазмідних ДНК  $Th^R$ -трансформантів продемонстрував, що вони зберегли молекулярні розміри і будову молекул гібридних плазмід.

Серед відібраних  $Th^R$ -трансформантів *S. globisporus* 1912 була виявлена низка зі змінами (в порівнянні з реципієнтною культурою, споруляцією та пігментоутворенням). Реципієнт (безплазмідний варіант штаму *S. globisporus* 1912-бп) рясно спорулює і утворює повітряний міцелій сніжно-білого кольору; субстратний

міцелій теж не має забарвлення. В той час як колонії ряду трансформантів утворюють мало спор, субстратний міцелій здобув помітне жовтаве забарвлення, що дозволило зробити попередній висновок про наявність каротиногенезу. Однак розсів повітряного та субстратного міцелію цих відібраних трансформантів не призвели до відбору колоній із бажаним фенотипом. Таким чином, наше попереднє припущення про наявність каротиногенезу у відібраних  $Th^R$ -трансформантів не підтверджено.

Синтез каротиноїдів спостерігали у  $Crt^+$ -трансформантів як після клонування *crt*-кластера, так і *crtS*-гена (продуктом якого є фактор, що регулює експресію *crt*-кластера) [7]. У якості штамів-реципієнтів таких гібридних плазмід використовували штами стрептоміцетів, що містять дезактивовані *crt*-кластери (як приклад штам *S. griseus* JA3933/956/2) чи інтактні криптичні *S. lividans* TK24. Наприклад, у  $Crt^+$ -трансформантів *S. griseus* JA3933, що отримали внаслідок клонування *crtEIBV*-генів, виявили здатність синтезувати лікопін – синтез здійснювався з промотора векторної плазмиди. Необхідно відмітити, що експресія *crt*-кластера проходила у трансформантів чи з промотора *tsrp* векторної плазмиди pJ486, чи з клонованого додаткового *crtEp* промотора з *crt*-кластера штаму *S. griseus* JA3933. Крім того, було отримано  $Crt^+$ -трансформанти, у яких транскрипція послідовностей *crt*-кластерів мала місце внаслідок суперпродукції сигмаподібного пептиду *CrtS* [7].

Таким чином, нами було сконструйовано і успішно клоновано гібридну плазмиду pWC 9,6 (16,2 т. п. н.), яка містила послідовність *crt*-кластера *S. globisporus* 1912 (9,6 т. п. н.). Отримані плазмиди pWC 9,6 здатні трансформуватися та стабільно функціонувати в клітинах як стрептоміцета, так і *E. coli*. Представлений експеримент з клонування додаткової копії *crt*-кластера в штамі *S. globisporus* 1912 бп не призвів до появи  $Crt^+$ -трансформантів.

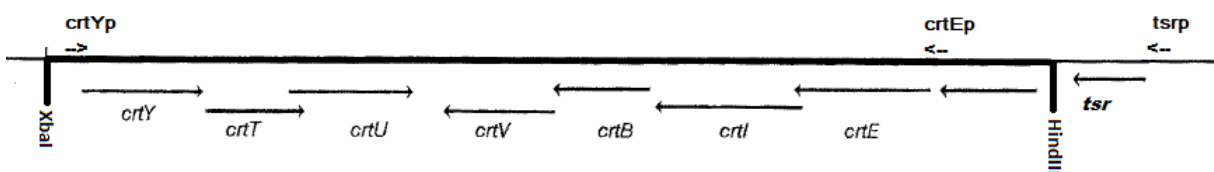


Рис. 2. Локалізація клонованого *Hind*III-*Xba*I фрагмента *crt*-кластера в плазміді pWC 9,6.

Можливо, ряд пояснень відсутності експресії crt-генів в отриманих стрептоміцетних Th<sup>R</sup>-трансформантах. Ми вважаємо, що в отриманих трансформантах не спостерігається синтез каротиноїдів у наслідок жорсткої регуляції експресії crt-кластерів. Така жорстка регуляція може бути пов'язана з наявністю в геномі штаму *S. globisporus* 1912 двох crt-кластерів [2].

Таке припущення підтверджується даними про дуже низьку частоту появи Cr<sup>t+</sup>-мутантів вихідного штаму *S. globisporus* 1912 – за десятиліття роботи зі штамом було отримано тільки

десяток спонтанних Cr<sup>t+</sup>-мутантів. У той же час спонтанні реверсії до Cr<sup>t-</sup> фенотипу стаються зі значно більшою частотою: як приклад – частота реверсії мутанта 4 Cr<sup>t+</sup> становить  $5 \times 10^{-3}$ . Такі дані свідчать про послаблення регуляції транскрипції crt-кластерів у наслідок мутації [2].

### Висновки

Отримано гібридну плазмиду рWC 9,6 (16, 2 т. п. н.), що здатна трансформуватися та стабільно функціонувати в клітинах як стрептоміцета, так і *E. coli*.

### Література

1. Зарецкая М.Ш., Нефелова М.В., Баратова Л.А., Полин А.Н. К вопросу о составе клеточных стенок 2 мутантов *Streptomyces chrysomallus*. *Антибиотики*. 1984. Т. 29, № 12. С. 902–906.
2. Полищук Л.В., Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П., Лук'янчук В.В. Спадкова мінливість ознаки синтезу каротиноїдів у *Streptomyces globisporus* 1912. *Мікроб. Журн.* 2013. Т. 75, № 5. С. 40–47.
3. Сverdlova A.N., Alekseeva L.N., Nefelova M.V. Влияние бета-иона на синтез каротинов штаммом *Actinomyces chrysomallus* var. *carotenoides*. *Микробиология*. 1977. Т. 45, № 6. С. 974–975.
4. Bianchi M. L., Grein A., Julitam P., Marnati P., Spalla C. *Streptomyces mediolani* (Arcamone et al.) emend. Bianchi et al. and its production of carotenoids. *Zeitschrift fur Allg. Mikrobiologie*. 1970. Vol. 10, № 4. P. 237–244.
5. Myronovskiy M., Tokovenko B., Manderscheid N., Petzke L., Luzhetskyy A. Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. *J Biotechnol.* 2013. Vol. 168, № 1. P. 117–118. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.013.
6. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H. et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 2008. Vol. 190, № 11. P. 4050–4060. doi: 10.1128/JB.00204-08.
7. Schumann G., Nurnberger H., Sandmann G., Krugel H. Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. *Mol Gen Genet.* 2006. Vol. 252, № 6. P. 658–666. doi: 10.1007/s004380050274.
8. Takano H., Asker D., Beppu T., Ueda K. Genetic control for light-induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006. Vol. 33, № 2. P. 88–93. doi: 10.1007/s10295-005-0005-z.
9. Полищук Л.В., Стефанишин Е.Е., Дехтяренко Т.Д., Стенько А.С., Заверуха В.Б., Мацелюх Б.П. Трансформация протопластов *Streptomyces* sp. 1912-8 с помощью ДНК плазмиды рSG1912. *Микробиол. Журн.* 1987. Т. 49, № 1. С. 24–28.
10. Полищук Л.В., Дехтяренко Т.Д., Стефанишин Е.Е., Мацелюх Б.П., Козырицкая В.Е. Плазмиды стрептомицетов глобиспориновой группы. *Микробиол. Журн.* 1985. Т. 47, № 4. С. 24–28.
11. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Спонтанна та індукована мінливість ознаки біосинтезу каротиноїдів *Streptomyces globisporus* 1912. *Мікробіол. журн.* 2008. Т. 70, № 6. С. 18–23.
12. Мацелюх Б.П., Лутченко В.А., Полищук Л.В. Синтез каротиноїдів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912. *Мікробіол. журн.* 2003. Т. 65, № 6. С. 24–30.
13. Каталог фірми МВІ. "Fermentas". 2016–2017.
14. Vara J., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y.-G. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*). *J. Bacteriology*. 1989. Vol. 171, № 3. P. 5872–5881. doi: 10.1128/jb.171.11.5872-5881.1989.
15. Валагурова В.Е., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*. Описание видов и компьютерная программа их идентификации. К.: Наукова думка, 2003. 645 с.
16. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study. *J. General Microbiol.* 1989. Vol. 80, № 1. P. 389–400. doi: 10.1099/00221287-80-2-389.
17. Funo N., Ohnishi Y., Ebizuka Y., Horinouchi S. Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 2002. Vol. 367, № 3. P. 781–789. doi: 10.1042/BJ20020953.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. 450 с.
19. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984. Vol. 12, № 1. P.19–36. doi: 10.1016/0147-619X(84)90063-5.

### References

1. Zaretskaia M.Sh., Nefelova M.V., Baratova L.A., Polin A.N. [Composition of cell walls of 2 mutant strains of *Streptomyces chrysomallus*]. *Antibiotiki*. 1984. Т. 29, № 12. S. 902–906.
2. Polishchuk L.V., Holembovska S.L., Matseliukh B.P., Lukyanchuk V.V. [Genetic variability of synthesis feature of carotenoids in *Streptomyces globisporus* 1912]. *Mikrobiol Zh.* (Kiev, Ukraine). 2013, Т. 75, № 5. S. 40–47.
3. Sverdlova A.N., Alekseeva L.N., Nefelova M.V. [The effect of beta-ionine on biosynthesis of carotenes by *Actinomyces chrysomallus* var. *carotenoides*]. *Mikrobiologiya*. 1977. Т. 45, № 6. S. 974–975.

4. Bianchi M. L., Grein A., Julitam P., Marnati P., Spalla C. *Streptomyces mediolani* (Arcamone et al.) emend. Bianchi et al. and its production of carotenoids. *Zeitschrift fur Allg. Mikrobiologie*. 1970. Vol. 10, № 4. P. 237–244.
5. Myronovskiy M., Tokovenko B., Manderscheid N., Petzke L., Luzhetskyy A. Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. *J Biotechnol*. 2013. Vol. 168, № 1. P. 117–118. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.013
6. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol*. 2008. Vol. 190, № 11. P. 4050–4060. doi: 10.1128/JB.00204-08.
7. Schumann G., Nurnberger H., Sandmann G., Krugel H. Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. *Mol Gen Genet*. 2006. Vol. 252, № 6. P. 658–666. doi: 10.1007/s004380050274.
8. Takano H., Asker D., Beppu T., Ueda K. Genetic control for light-induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006. Vol. 33, № 2. P. 88–93. doi: 10.1007/s10295-005-0005-z.
9. Polishchuk L.V., Stefanishin E.E., Dekhtiarenko T.D., Sten'ko A.S., Zaverukha V.B. [Transformation of *Streptomyces* sp. 1912-8 protoplasts using plasmid pSG 1912 DNA]. *Mikrobiol Zh.* (Kiev, Ukraine). 1987. T. 49, №1. S. 24–28.
10. Polishchuk L.V., Dekhtiarenko T.D., Stefanishin E.E., Matseliukh B.P., Kozyriskaia V.E., [Plasmids of globisporine group *Streptomyces*]. *Mikrobiol Zh.* (Kiev, Ukraine). 1985. T. 47, № 4. S. 24–28.
11. HOLEMBIOVSKA S.L., MATSELIUKH B.P. [Spontaneous and induced variability of carotenoid biosynthesis characteristics in *Streptomyces globisporus* 1912]. *Mikrobiol Z.* 2008. T. 70, № 6. S. 18–23.
12. Matseliukh B.P., Lutchenko V.A., Polishchuk L.V. [Synthesis of carotenoids by mutant strains of *Streptomyces globisporus* 1912]. *Mikrobiol Zh.* (Kiev, Ukraine). 2003. T. 65, № 6. S. 24–30.
13. Catalog of the MBI. "Fermentas". 2016–2017.
14. Vara J., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y.-G. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J. Bacteriology*. 1989. Vol. 171, № 3. P. 5872–5881. doi: 10.1128/jb.171.11.5872-5881.1989.
15. Valagurova E.V., Kozyriskaia V.E., Iutinskaia G.A. Actinomycetes of *Streptomyces* genus. Description of species and computer program for their identification. Kiyv: Naukova dymka, 2003. 645 s.
16. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study. *J. General Microbiol*. 1989. Vol. 80, № 1. P. 389–400. doi: 10.1099/00221287-80-2-389.
17. Funa N., Ohnishi Y., Ebizuka Y., Horinouchi S. Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 2002. Vol. 367, № 3. P. 781–789. doi: 10.1042/BJ20020953.
18. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Methods of genetic engineering. Molecular cloning. Moscow: Mir, 1984. 450 s.
19. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984. Vol. 12, № 1. P. 19–36. doi: 10.1016/0147-619X(84)90063-5.

#### LUKYANCHUK V.V., POLISHCHUK L.V.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,

Ukraine, DO3680, Kyiv, MSP, Zabolotny str., 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

#### CLONING OF SEQUENCE OF HOMOLOGOUS crt-CLUSTER IN *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-6П

**Aim.** The aim was to set influence to the additional homologous crt-cluster on carotenogenesis of cells of streptomycete recipient. **Methods.** For this purpose transformation by the hybrid plasmid pWC 9,6 was conducted. This plasmid contained the fragment of the crt-cluster sequence (9576 bp) of  $Crt^+$ -mutant *S. globisporus* Crt4 in a  $Crt^-$ -recipient *S. globisporus* 1912-6П. To construct this hybrid plasmid, a fragment of PLR-copies of sequence of the crt-cluster of mutant *S. globisporus* 1912 Crt4 was cloned in the shuttle vector pWHM4 (6.6 kb). Insertion was done into unique restriction sites for endonucleases XbaI and HindIII in a polylinker of this vector. These endonucleases have not restriction sites into the crt-cluster sequence. **Results.** The plasmid pWC 9,6 (16.2 kb) that contains the crt-cluster sequence (9576 bp) of the  $Crt^+$ -variant Crt4 of the strain *S. globisporus* 1912 was constructed. The plasmid successfully functions in the cells of both recipients (*E. coli* XL1 Blue and *S. globisporus* 1912-6П). It provides to them resistance to the corresponding antibiotics. The plasmid pWC 9,6 stably keeps its molecular size (16.2 kb). However, indisputable proofs of expression of the crt-clusters in transformants were not got. **Conclusions.** The plasmid pWC 9,6, that is able to transform and stably function in the cells of both recipient microorganisms (*Streptomyces* and *E. coli*) was constructed.

**Keywords:** crt-cluster, shuttle vector, cloning, resistance, PCR.