



УДК 577.113.5 : 577.212.2'152.31 *412

© 1993 И. В. Гавриленко, Г. Е. Байда,
А. В. Карпов, Н. П. КузьминНУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ ФОСФОЛИПАЗЫ
С И СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ *Bacillus cereus* ВКМ-В164

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, г. Пущино Московской обл.

Bacillus cereus — широко распространенный токсикогенный микроорганизм [1]. Клонирование и идентификация генов потенциальных факторов патогенности *B. cereus* и создание на их основе ДНК-зондов для тестирования и классификации патогенных штаммов представляет большой интерес для медицины, сельского хозяйства и экологии.

К числу метаболитов *B. cereus*, рассматриваемых в качестве потенциальных факторов патогенности этого микроорганизма, относятся фосфатидилхолин- и сфингомиелинспецифичные фосфолипазы С (РС-PLC, КФ 3.1.4.10, и SM-PLC, КФ 3.1.4.12) [1]. Несмотря на кажущуюся очевидность действия РС-PLC и SM-PLC на клетки-мишени, вклад этих ферментов в вирулентность *B. cereus* пока не ясен. Известно, что сфингомиелиназа (SM-PLC) способна лизировать эритроциты. Гемолитическое действие SM-PLC зависит от доли содержания сфингомиелина в мембранах эритроцитов и связано с гидролизом сфингомиелина в составе эритроцитарной мембраны [2]. Фосфолипаза С (как часто называют РС-PLC) не является гемолитином и не способна гидролизовать фосфатидилхолин (лецитин) в составе мембраны интактных эритроцитов [3]. Тем не менее РС-PLC следует относить к потенциальным факторам патогенности *B. cereus* — в присутствии РС-PLC наблюдается усиление гемолитического действия SM-PLC [3, 4]. После установления тандемного расположения генов РС-PLC и SM-PLC на хромосоме *B. cereus* [4—7] двухкомпонентный гемолитический фактор, представляющий собой смесь этих ферментов, получил название цереолизина АВ [4].

К настоящему времени определена первичная структура генов РС-PLC и SM-PLC *B. cereus* штаммов SE-1 [6, 7] и GP-4 [4] и гена SM-PLC *B. cereus* IAM-1208 [5]. Данная работа посвящена клонированию и определению нуклеотидной последовательности тандемно расположенных генов РС-PLC и SM-PLC *B. cereus* ВКМ-В164.

Клонирование области хромосомы *B. cereus* ВКМ-В164, содержащей гены РС-PLC и SM-PLC, проходило в два этапа. Первоначально из банка генов *B. cereus* ВКМ-В164, полученного путем клонирования продуктов неполного гидролиза хромосомной ДНК рестриктазой *Sau3AI* в *Bam*HI-сайт векторного фага лямбда (λ47.1), был отобран рекомбинантный фаг лямбда-Н2, вызывающий у хозяйских клеток *Escherichia coli* Z85 [8] гемолитический фенотип. Рекомбинантная ДНК этого фага содержала *Sau3AI*-фрагмент хромосомной ДНК *B. cereus* ВКМ-В164 размером 2,2 т.п.о., делеционные производные которого, переклонированные в векторные плазмиды pUC18/19 (рис. 1а, б), были использованы для определения нуклеотидной последовательности *Sau3AI-EcoRV*-фрагмента методом Максама—Гилберта [9]. Полученная последовательность сравни-

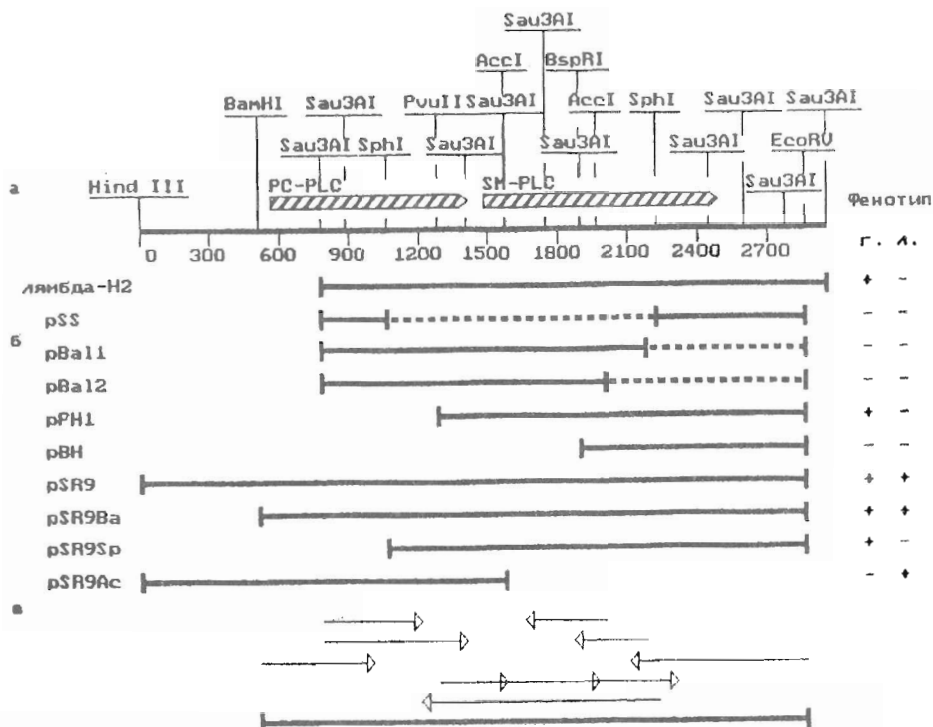


Рис. 1. Физическая и генетическая карта *HindIII-Sau3AI*-фрагмента хромосомной ДНК *B. cereus* VKM-B164, содержащего гены PC-PLC и SM-PLC (а). Субклонирование и функциональный анализ *Sau3AI-EcoRV*- и *HindIII-EcoRV*-фрагментов в клетках *E. coli* (тестирование трансформантов *E. coli* на гемолитическую (г.) и лецитиназную (л.) активности проводилось согласно рекомендациям, описанным в работе [4]) (б). Стратегия секвенирования *BamHI-EcoRV*-фрагмента (в)

валась с нуклеотидными последовательностями генов PC-PLC и SM-PLC *B. cereus* [5, 6] и была идентифицирована как содержащая часть гена PC-PLC и полный ген SM-PLC, о чем сообщалось ранее [10].

Для получения фрагмента ДНК, содержащего целые гены обоих ферментов, хромосомную ДНК *B. cereus* VKM-B164 гибридизовали с секвенированным *Sau3AI-EcoRV*-фрагментом, использованным в качестве ДНК-зонда. Таким образом удалось идентифицировать клонированный в плазмиду pUC19 *HindIII*-фрагмент хромосомной ДНК *B. cereus* VKM-B164 (размером около 7,2 т.п.о.). Трансформация клеток *E. coli* Z85 рекомбинантными плазмидами, содержащими этот фрагмент, приводила к появлению (помимо гемолитического) лецитиназного фенотипа. При субклонировании *HindIII*-фрагмента была получена рекомбинантная плаزمид pSR9Ba, содержащая в качестве вставки *BamHI-EcoRV*-фрагмент хромосомной ДНК *B. cereus* VKM-B164, включающий в себя секвенированный *Sau3AI-EcoRV*-фрагмент и недостающую часть гена PC-PLC (*BamHI-Sau3AI*-фрагмент) (рис. 1). Нуклеотидную последовательность *BamHI-Sau3AI*-фрагмента определяли с помощью дидезоксинуклеотидного метода [9].

Полная нуклеотидная последовательность генов PC-PLC и SM-PLC *B. cereus* VKM-B164 зарегистрирована в банке данных EMBL (код X64141) и представлена

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность *BamHI-EcoRV*-фрагмента хромосомной ДНК *B. cereus* VKM-B164, содержащего гены PC-PLC и SM-PLC. Одинарной линией подчеркнуты последовательности, кодирующие предполагаемые лидерные пептиды, двойной — предполагаемые области Шайна—Далгарно. Вертикальной чертой обозначен конец полученной ранее последовательности фрагмента ДНК *B. cereus* SE-1 [6, 7].

1 GGATCCTACAAAAAGTTTACAATAATTCGATTAATAAAATGGAGGATTTCAG SD-PC-PLC Met Lys Lys Lys Val Leu Ala Leu Ala Ala Ala GCT
 85 ATT ACA GTA GTA GCT CCT TTA CAA AGC GTT Val Ala Phe Ala His Glu Asn Asp Gly Ser Lys Ile Lys Ile GCA GCT
 Val His Arg Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Lys Glu Gly Val Asn Ser His Leu Trp Ile Val Asn Arg Ala
 157 GTT CAC CGC TGG TCT GCT GAA GAT ACA Thr Thr Leu Val Lys Glu Asn Ser His CAT CAT TTA TGG ATT GTA AAC CGT GCG
 Ile Asp Ile Met Ser Arg Asn Thr Thr Leu Val Lys Glu Asn Ser His Leu Trp Ile Val Asn Arg Ala
 229 ATT GAT ATT ATG TCT CGC AAT ACA Thr Thr Leu Val Lys Glu Asn Ser His CAT CAT TTA TGG ATT GTA AAC CGT GCG
 Glu Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Ala Ala Asp Tyr Glu Asn Pro Tyr Tyr Asp Asn Ser Thr Phe Ala Ser His
 301 GAG TTA GAG AAC GCT ATT GCT GCT GAT TAT GCT GAC TAT GAA AAT CCT TAT TAT GAT AAT AGC ACA TTT GCT TCA CAT
 Phe Tyr Asp Pro Asp Asn Gly Thr Tyr Ile Pro Phe Ala Lys Glu Thr Thr Gly Ala Lys Tyr
 373 TTC TAT GAT CCA GAC AAT GGA AAA ACA TAT ATT CCA TTT GCA AAG CAG GCA AAA GAA ACT GGC GCT AAA TAT
 Phe Lys Leu Ala Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Phe Phe Tyr Leu Leu Ser Leu
 445 TTT AAA GCT GGT GAA TCA TAC AAA AAT AAT AAT AAT GAT ATG AAA CAA GCA TTC TTT TTA GGA TTA TCT CTT
 His Tyr Leu TTA GGA GAT GTA AAC CCG ATG CAT GCG GCA AAC TTT ACA AAT Ser Tyr Pro Gln Gly Phe
 517 CAT TAT TTA GGA GAT GTA AAC CCG ATG CAT GCG GCA AAC TTT ACA AAT Ser Tyr Pro Gln Gly Phe
 His Ser Lys Tyr Glu Asn Phe Val Asp Thr Ile Lys Asp Asn Tyr Lys Val Thr Asp Gly Asn Gly Tyr Trp
 589 CAT TCT AAA TAT GAA AAC TTT GIA GAT ACG ATA AAA GAT AAT TAT AAA GTA ACG GAT GGA AAT GGA TAT TGG
 Asn Trp Lys Gly Thr Asn Pro Glu Glu Trp Ile His Gly Ala Val Val Val Ala Lys Gln Asp Tyr Ser Gly
 661 AAC TGG AAA GGT ACA AAT CCA GAA GAG TGG ATT CAT CGA GCG GCA GTA GTA GGG AAA CAA GAT TAC TCT GGA
 Ile Val Asn Asp Asn Thr Lys Asp Trp Phe Val Lys Ala Ala Val Ser Gln Glu Tyr Ala Asp Lys Trp Arg
 733 ATT GTA AAT GAT AAT ACG AAA GAT TGG TTC GTA AAA GCA CCT GTG TCA CAA GAA TAT GCA GAT AAA TGG CCG
 Ala Glu Val Thr Pro Met Thr Gly Lys Arg Leu Met Asp Ala Gln Arg Val Thr Ala Gly Tyr Ile Gln Leu
 805 GCT GAA GTT ACA CCA ATG ACA GGT AAG CGA TTA ATG GAT GCA CAA CGT GTT ACT GCT GGA TAC ATT CAG CTT
 Trp Phe Asp Thr Tyr Gly Asp Arg ***
 877 TGG TTT GAT ACG TAC GGA GAT CGT TAA GTATTTAAAAAGGTCAAAATCTCACAAATAGAGTATTGGACCTTTTATTACTATACA
 SD SM-PLC Val Lys Gly Val Leu Ser Phe Gly Ile Gly Leu Gly Val Leu Tyr
 963 AATGGAGGTATGGAAC GTG AAA GGT AAA ITG CTA AAA GGT GTA CTT ACG TTT GGG ATT GGT TTA GGA GTT TTA TAC
 Gly Gly Ser Ser Val Gln Ala Asp Thr Thr Ser Thr Leu Lys Val Met Thr His Asn Val
 1037 GGA GGT TCT TCA GTG CAA GCA GAT ACG TCT ACA GAT CAA AAC ACG ACT TTG AAA GTG AAA GTG ATG ACG CAC AAC GTG

Рис. 2 (начало)

на рис. 2. С помощью программы анализа последовательностей MicroGenie [11] осуществлено выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей генов PC-PLC и SM-PLC *B. cereus* BKM-B164 с соответствующими последовательностями для *B. cereus* штаммов SE-1 [6, 7] (код EMBL X12854), IAM-1208 [5] (код EMBL X12711) и GP-4 [4]. Оказалось, что нуклеотидная последовательность генов PC-PLC и SM-PLC *B. cereus* BKM-B164 полностью совпадает с таковой для *B. cereus* SE-1 [6, 7]. Напротив, полученные последовательности генов заметно отличаются от соответствующих последовательностей штаммов IAM-1208 [5] и GP-4 [4]. Так, по сравнению со штаммом GP-4 в последовательности, кодирующей зрелую PC-PLC, имеется 31 нуклеотидная замена; в последовательности, кодирующей зрелую SM-PLC,—89 нуклеотидных замен, 1 вставка и 1 делеция. По сравнению со штаммом IAM-1208 в последовательности, кодирующей зрелую SM-PLC, имеется 89 нуклеотидных замен. В то же время следует отметить, что нуклеотидные последовательности, кодирующие зрелую SM-PLC штаммов GP-4 и IAM-1208, практически полностью совпадают (3 нуклеотидные замены, 1 вставка и 1 делеция).

Ранее в работе [4] уже проводилось сравнение нуклеотидных последовательностей генов PC-PLC *B. cereus* штаммов GP-4 и SE-1. По мнению авторов [4], различия, обнаруженные в этих последовательностях, не связаны с проявлением внутривидовых различий, а обусловлены мутантной природой штамма SE-1, полученного путем нитрозогуанинового мутагенеза клеток *B. cereus* штамма ATCC-10987 и представляющего собой суперпродуцент по PC-PLC. В пользу предложенной интерпретации свидетельствует и практически полное совпадение нуклеотидных последовательностей генов SM-PLC в природных штаммах IAM-1208 и GP-4. Однако полное совпадение последовательности генов PC-PLC и SM-PLC «дикого» штамма *B. cereus* BKM-B164 (выделенного в качестве контаминанта из аптечного вазелинового масла) с соответствующей последовательностью штамма SE-1 указывает на то, что полученная для него нуклеотидная последовательность не является артефактом мутагенеза. Таким образом, различие нуклеотидных последовательностей генов SM-PLC (и PC-PLC), обнаруживаемое между парами штаммов *B. cereus* (SE-1 и BKM-B164, с одной стороны, и GP-4 и IAM-1208 — с другой), однозначно свидетельствует об имеющемся внутривидовом разнообразии структур этих генов.

Авторы выражают искреннюю благодарность В. М. Крюкову и В. Н. Ксензенко за помощь в проведении секвенирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turnbull P. C. B.//Pharmacology of Bacterial Toxins/Eds Dorner F., Drews J. Oxford: Pergamon Press, 1986. P. 397—448.
2. Ikezawa H., Mori M., Taguchi R.//Arch. Biochem. and Biophys. 1980. V. 199. № 2. P. 572—578.
3. Verkleij A. J., Zwaal R. F. A., Roelofs B., Comfurius P., Kastelijn D., Van Deenen L. L. M.//Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 323. № 2. P. 178—193.
4. Gilmore M. S., Cruz-Rodz A. L., Leimeister-Wachter M., Kreft J., Goebel W.//J. Bact. 1989. V. 171. № 2. P. 744—753.
5. Yamada A., Tsukagoshi N., Uda S., Sasaki T., Nakino S., Nakamura S., Little C., Tomita M., Ikezawa H.//Eur. J. Biochem. 1988. V. 175. № 2. P. 213—220.
6. Johansen T., Holm T., Guddal P. H., Sletten K., Haugli F. B., Little C.//Gene. 1988. V. 65. № 2. P. 293—304.
7. Johansen T., Haugli F. B., Ikezawa H., Little C.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 21. P. 10370.
8. Зайцева Е. Н., Зайцев Е. М., Бакланова И. В., Горелов В. Н., Кузьмин Н. П., Крюков В. М., Ланцов В. А.//Генетика. 1986. Т. 22. № 11. С. 2721—2727.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

10. Гавриленко И. В., Крюков В. М., Кузьмин Н. П. // 2-я Всесоюз. конф. «Бактериальные токсины». Тезисы. Юрмала, 1989. С. 25.
11. Queen C. L., Korn L. J. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 1. P. 581—599.

Поступило в редакцию
6.VIII.1992

I. V. GAVRILENKO, G. E. BAIDA, A. V. KARPOV, N. P. KUZMIN

NUCLEOTIDE SEQUENCE FOR THE PHOSPHOLIPASE C AND SPHINGOMYELINASE GENES FROM *Bacillus cereus* VKM-B164

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

A *Bam*HI-*Eco*RV DNA fragment, containing tandemly arranged genes for the *Bacillus cereus* VKM-B164 phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase, has been cloned and sequenced in pUC19 plasmid (EMBL accession № X64141). The obtained gene sequences have been compared with those the *B. cereus* strains SE-1, IAM-1208 and GP-4 reported previously. Both phospholipase C and sphingomyelinase gene sequences of the VKM-B164 strain were found to be identical to those of the strain SE-1 and to differ from the sequences of GP-4 and IAM-1208 strains, containing another version of the gene sequences.