

19. Murrai N., Sutton D. W., Murrai M. G. et al. Science, 222, 476, 1983.
20. Murooka Y., Takizawa N., Harada T. II. J. Bacteriol. 145, 358, 1981.
21. Piruzian E., Andrianov V. et al. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 365, 1981.
22. Resibois A., Toussaint A., van Gijsegem F., Faelen M. Gene, 14, 103, 1981.
23. Shapiro J. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 1933, 1979.
24. Taylor A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50, 1043, 1963.
25. van Leeerdam E., Goosen T., Plasterk R., van de Putte P. Gene, 13, 111, 1981.

«Биолог. ж. Армении», т. XXVIII, № 11, 1985

УДК [577.214.622:577.152.41:579.842.24]:579.812.11

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ПЕКТАТЛИАЗЫ ERWINIA CHRYSANTHEMI В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI

Н. О. БУКАНОВ, М. Ю. ФОНШТЕПН, А. И. КАРАСИН, О. А. ТОЛМАЧЕВ,

С. И. АЛИХАНИЯ, Н. К. ЯНКОВСКИЙ

Гены пектатлиазы (ptl) штамма *E. chrysanthemi* ENA49 клонировали в клетках *Escherichia coli* на фаговом векторе λ47.1. Гибридизационный анализ показал, что гены *ptl* тесно сцеплены и локализованы на *Eco*RI-фрагменте хромосомной ДНК *E. chrysanthemi* протяженностью 7,3 т. п. н. Фрагменты ДНК, содержащие гены *ptl*, а также прилегающие к ним области хромосомы *E. chrysanthemi* ENA49 клонировали на фагово-плазмидном векторе. Проведены субклонирования генов *ptl* на многокопийной плазмиде pUC19.

Ключевые слова: генная инженерия, пектатлиазы, молекулярное клонирование, экспрессия гена.

Фитопатогенные бактерии рода *Erwinia* секретируют во внеклеточное пространство ряд пектолитических ферментов, которые разрушают первичную стенку растительных клеток и вызывают мацерацию растительных тканей [4, 5, 7, 15, 16]. Фермент пектатлиаза (EC 4.2.2.2) продуцируется *Erwinia* sp. и накапливается в культуральной среде до концентрации около 100 мг/дигр [4, 5]. Гены пектатлиазы могут быть использованы в качестве удобной модельной системы для изучения механизмов секреции белка во внеклеточное пространство у граммотрицательных бактерий. Электрофоретический анализ белков культуральной жидкости после выращивания бактерий штамма ENA49 позволил обнаружить 6 ферментов (изоферментов), характеризующихся пектатлиазной активностью [2]. Это позволяет предположить, что синтез пектатлиаз в клетках штамма ENA49 обусловлен несколькими генами.

Ранее мы осуществили клонирование структурного гена пектатлиазы штамма ENA49 в клетках *E. coli* на фаговом векторе λ47.1 [1]. BamHI-фрагмент ДНК протяженностью 4 т. п. н., общий для всех Ptl-фагов, переклонировали с помощью многокопийной плазмиды pUC19. Гибридные плазмиды pEAN4 и pEAN11, содержащие BamHI-фрагмент в противоположных ориентациях, использовали в качестве радиоактив-

но меченых зондов в гибридизационных экспериментах. При помощи гибридизационного анализа показали, что клонированный ген представлен на хромосоме штамма ENA49 в 1 копии. Структурный ген пектатлиазы, клонированный в составе гибридных плазмид pEAN4 и pEAN41, обозначили pIIA [1].

В представленной работе приводятся результаты молекулярного клонирования генов пектатлиазы штамма *E. winif. chrysanthemi* ENA49 в клетках *E. coli* на фаговом и фагово-плазмидных векторах. Итогом работы явилось клонирование и характеристика еще одного гена пектатлиазы, обозначенного pIIB.

Материал и методика. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Таблица 1
Использованные бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы и плазмиды	Характеристики	Источник
<i>E. coli</i> Q 358	thr ⁻ leu ⁻ sup ⁺ E r ⁻ m ⁺	[10]
Q 359	thr ⁻ leu ⁻ sup ⁺ E r ⁻ m ⁺ (P 2)	[10]
QR 48	sup ⁺ E recA ⁻ r ⁻ m ⁺	[10]
BHB 2538	met ⁻ [Al 434 Cl ₁₃ red E _{am} S _{am}]/λ	[9]
BHB 2690	met ⁻ [Al 434 Cl ₁₃ red D _{am} S _{am}]/λ	[9]
TG1	r ⁻ m ⁺ lac pro suII thi (F' tra D 35 pro AB lacI ^S ZAM 15)	
<i>E. chrysanthemi</i>		
ENA49	lac ⁻ str ^S	[2]
Векторы λ 47.1	h ⁺ ΔscI 1—2 (434 cl ⁻ pII 5)	[10]
pUC 19	Ap ^r	[18]
pEMBL 8 (—)	Ap ^r	[6]

Питательные среды. использовали 1, 2%-ный агар Хоттингера, 1-бульон и 1,2%-ный агар.

Ферменты нуклеотидного обмена. ферменты рестрикции, T4 ДНК-полинуклеотидлигазу (Вильямсский ОПЗ ферментных препаратов), ДНК-полимеразу («Amersham», Англия) использовали в условиях, рекомендованных изготовителем.

Электрофорез образцов ДНК проводили в 0,7—1,5%-ных агарозных гелях в Трис-ацетатном буфере [12].

Выделение ДНК плазмид проводили щелочным методом [3]. Хромосомную ДНК штамма ENA49 выделяли методом Мармура [13] с незначительными модификациями. ДНК фагов—как описано [10].

Определение пектатлиазной активности проводили *in situ* на индикаторных средах как описано ранее [1].

Методика ДНК гибридных фагов в каскад фага λ, осуществляли по описанному методу [9].

Трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК проводили по описанному методу [14].

Гибридизацию по Саузерну на нитроцеллюлозных фильтрах проводили как описано в работе [12]. В гибридизационных экспериментах использовали плазмидную

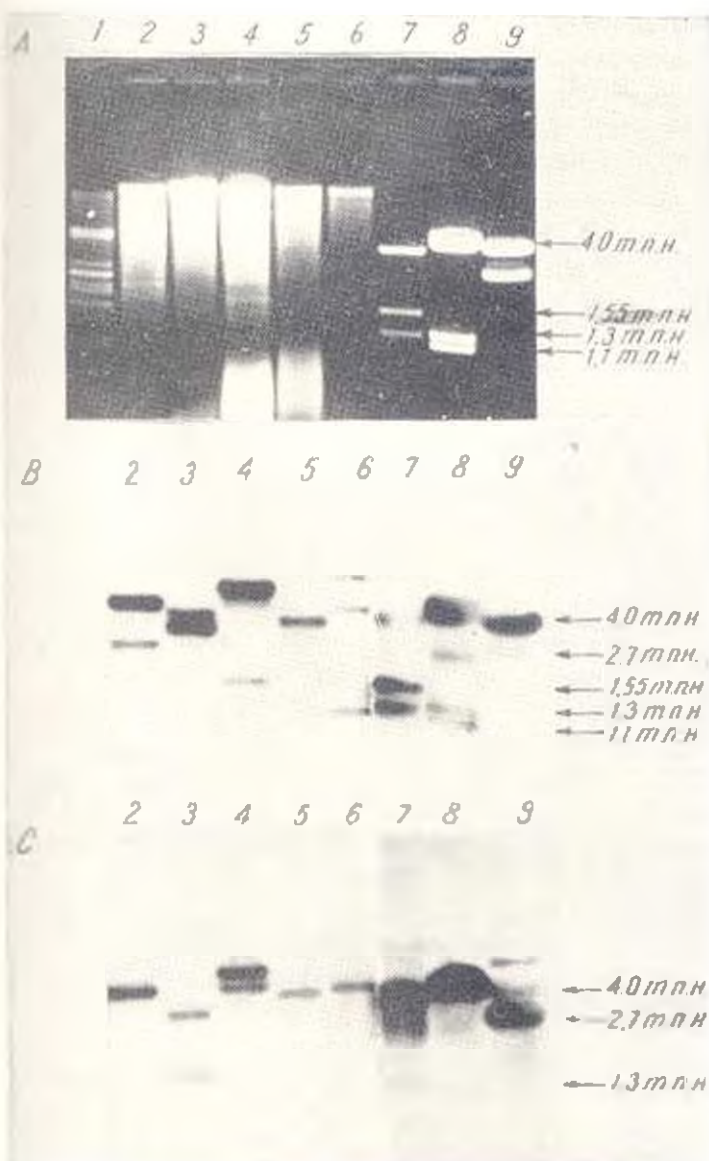


Рис. 1. Гибридизация по Сауверну. 32 P-меткой ДНК плазмиды pEAN1 (автордиограмма B) и pMB1p1-1 (автордиограмма C) с рестриктами плазмид pEAN1, pEAN1 и хромосомной ДНК штамма EAX19 (электрофоретрама A): 1) ДНК-лестница; 2) обработанная ферментом PstI; 3) хромосомная ДНК штамма EAX19, обработанная ферментами PstI, KpnI, EcoRI, BamHI, SalI соответственно; 4) ДНК pEAN1, обработанная SalI; 5) ДНК pEAN1, обработанная SalI; 6) ДНК pEAN1, обработанная BamHI.

ДНК, меченную радиоактивным фосфором при помощи кинк-трансляции [11]. ДНК из агарозных гелей переносили на нитроцеллюлозные фильтры методом двустороннего переноса [17].

Отмывку фильтров после гибридизации проводили в жестких условиях [12].

Результаты и обсуждение. Мы осуществили клонирование *EcoRI*-фрагментов хромосомной ДНК штамма ENA49 на фаговом векторе λ 47.1 в клетках *E. coli*. Среди 1500 рекомбинантных клонов на индикаторной среде идентифицировали 2 клон, обладающих пектатиназной активностью. Рестрикционный анализ плазмидной ДНК из этих клонов показал, что они содержат идентичные фрагменты хромосомной ДНК штамма ENA49. *EcoRI*-фрагменты ДНК гибридного фага переклонировали на мультикопийную плазмиду pEMBL8 (+). Клетки *E. coli* TG1, содержащие гибридную плазмиду, обозначенную pEMBLptII, проявляли пектатиназную активность. Плазмиды pEMBLptII, содержащая фрагмент чужеродной ДНК протяженностью около 7 т. п. н., характеризуется значительной нестабильностью. В процессе последовательных пересевов субклонов с гибридной плазмидой наблюдали уменьшение размеров лунок, образуемых колониями бактерий на индикаторной среде. Некоторые субклоны полностью утрачивали пектолитическую активность. После 2-кратного пересева колоний на среду с полипектатом и дальнейшем подробно исследовался один из Pil^+ клонов, обозначенный *E. coli* TG1 (pEMBLptII-1). ДНК плазмиды pEMBLptII-1, меченную радиоактивным фосфором, гибридизовали по Саузерну с ДНК плазмид pEAN4 и pEAN41, обработанных рестриктазами *Bam*HI и *Sall*, а также с хромосомной ДНК штамма ENA49, обработанной рестриктазами *Pst*II, *Kpn*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sall* (рис. 1С). Те же образцы ДНК, перенесенные на целлюлозу с того же геля, гибридизовали с меченой ДНК плазмиды pEAN4 (рис. 1В). Анализ автордиограмм показал, что фрагмент ДНК штамма ENA49, клонированный в составе плазмиды pEMBLptII-1, не гибридизуется с *Sall*-субфрагментами размером 1,55 и 1,1 т. п. н. и очень слабо гибридизуется с *Sall*-субфрагментом 1,3 т. п. н. плазмиды pEAN4. Таким образом, на плазмиде pEMBLptII-1 находится ген (или гены) пектатиназы, не гомологичный клонированному ранее гену *ptIA*. Новый ген обозначен как *ptIB*. Характер гибридизации плазмид pEAN4 и pEMBLptII-1 с фрагментами хромосомной ДНК штамма ENA49 также указывает на то, что последовательности ДНК, клонированные в составе этих плазмид, не идентичны, но, по-видимому, представляют тесно сцепленные области хромосомы штамма ENA49, так как фрагменты *Pst*II (5,2 т. п. н.), *Kpn*I (3,8 т. п. н.) *Eco*RI (7,3 т. п. н.) и *Sall* (5,2 т. п. н.) хромосомной ДНК штамма ENA49 гибридизуются как с ДНК плазмиды pEAN4, так и ДНК плазмиды pEMBLptII-1 (табл. 2).

Для подтверждения сцепленности детерминант, определяющих синтез пектатиназы в клетках штамма ENA49, получили библиотеку *Eco*RI-фрагментов хромосомной ДНК штамма ENA49 на фагово-плазмидном векторе, сконструированном в нашей лаборатории. Среди примерно 11000 рекомбинантных фагов идентифицировали 45 негативных

Таблица 2

Фрагменты хромосомной ДНК штамма ENA49, гибридизующиеся с ДНК плазмид рЕАН4 с рЕМВLptI-1

Меченая проба	Размеры (т. п. н.) гибридизующихся фрагментов ДНК, обработанных рестриктазами				
	Pst I	Kpn I	EcoR I	BamH I	Sal I
рЕАН 4	5.2 2.8	4.5 3.8	7.3 1.7	4.0	9.0 5.2 1.3
рЕМВLptI-1	5.2	3.8 1.6	7.3 5.4	5.0	5.2

колоний, погружившихся в полипектат натрия. Рестрикционный анализ ДНК, выделенной из 12-ти проанализированных фагов, показал, что все они содержат EcoRI фрагмент ДНК штамма ENA49 протяженностью 7,3 т. п. н. Гибридные молекулы, сконструированные на основе фагово-плазмидного вектора, могут размножаться в клетках в виде фага или наследоваться в клетках в виде плазмиды. Плазмидная часть фагово-плазмидного вектора представляет собой ДНК плазмиды рUC19. Встраивание фрагментов ДНК штамма ENA49 осуществляли по рестрикционным сайтам, расположенным в последовательности рUC19-компонента фагово-плазмидного вектора (рис. 2). Последовательно об-

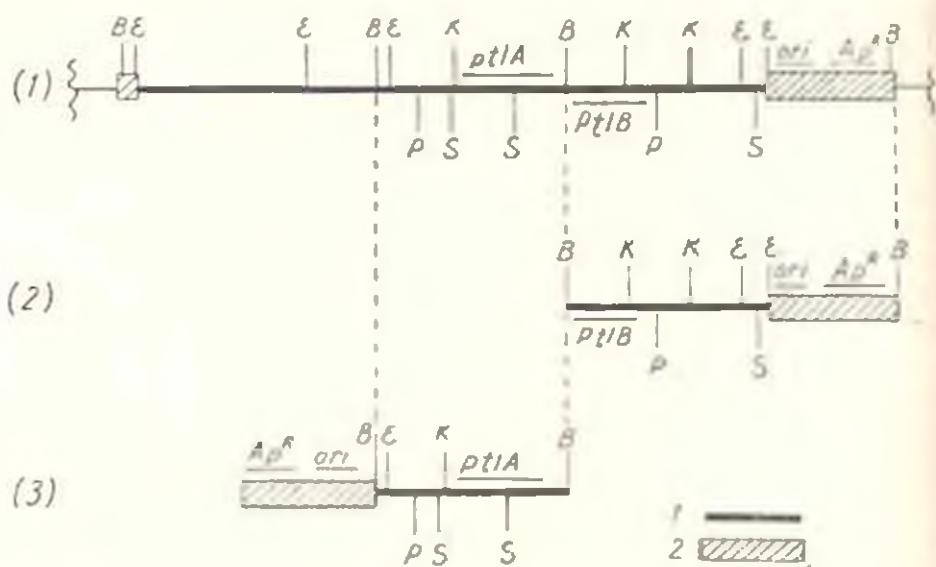


Рис. 2. Рестрикционные карты ДНК гибридного фага рМК2 (1) и ДНК плазмид рМК2-1 (2) и рЕАН4 (3). B, E, K, P, S — участки узнавания рестриктазами BamHI, EcoRI, KpnI, PstI, SalI соответственно. ■ ДНК штамма ENA49, ▨ плазмидная ДНК (рUC19) фагово-плазмидного вектора

работка ДНК гибридных молекул подходящей эндонуклеазой рестрикции и лигазой, можно осуществить субклонирование фрагментов чужеродной ДНК на плазмиде рUC19. Для дальнейшего анализа использовали гибридный фаг, обозначенный рМК2 (рис. 2). ДНК фага

pMK2 обрабатывали рестриктазой BamHI, лигазой и трансформировали в клетки *E. coli* TG1. Из трансформантов *E. coli*, отобранных на среде с ампициллином (50 мкг/мл), выделили плазмиду, обозначенную pMK2-1. Клоны *E. coli*, содержащие плазмиду pMK2-1, проявляют пектатлиазную активность на чашках с индикаторной средой. Плазмида pMK2-1 стабильно поддерживается в клетках *E. coli*, так как при последовательных пересевах на индикаторную среду с полипектатом патрия вокруг колоний образуются лунки одинакового размера.

По-видимому, характер локализации генов *ptl* на хромосоме зависит от штамма. В работе [8] показано тесное сцепление генов *ptl* в штамме *E. chrysanthemi* B 374. Кини со соавт. показали, что в штамме *E. chrysanthemi* EC16 гены *ptl* отстоят друг от друга по крайней мере на 40 т. п. н. [19]. Нами установлено тесное сцепление двух генов *ptl* в штамме *E. chrysanthemi* ENA49.

ВНИИГенетика, Москва

Поступило 11 IX 1985 г.

ERWINIA CHRYSANTHEMI ՊԵԿՏԱՏԼԻԱԶԱՅԻ ԳԵՆՆԵՐԻ ՄՈԿԵԿՈՒՄԱՐ ԿԼՈՆԱԿՈՐՈՒՄԸ *ESCHERICHIA COLI* ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ

Ն. Օ. ԲՈՒԿԱՆՈՎ, Մ. ՅՈՒ. ՖՈՆՏԵՅՆ, Ա. Ի. ԿԱՐԱՍԻՆ, Օ. Ա. ԵՈԼՄԱՇԵՎ,

[Ս. Ի. ԱԼԻԽԱՆԻԱՆ] Ն. Կ. ՅԱՆԿՈՎՍԿԻ

E. chrysanthemi ENA 49 շտամի պեկտատլիազայի (*ptl*) գեները կլոնավորվել են *Escherichia coli* բջիջներում λ47.1 ֆագային վեկտորի վրա: ԴնԹ-ի կոնավորված հաջորդականությունների հիբրիդիզացիոն անալիզը ցույց է տվել, որ *ptl* գեները սերտորեն կապված և տեղափոխված են *E. chrysanthemi* բրոմոսոմային ԴնԹ-ի EcoRI-ֆրագմենտում 7,3 կ. Ֆ. գ. երկարությամբ: *ptl* գեները պարունակող ԴնԹ-ի ֆրագմենտները, ինչպես և *E. chrysanthemi* ENA 49 բրոմոսոմի նրանց հարող շրջանները կլոնավորվել են ֆագա-պլազմիդային վեկտորի վրա: Իրականացվել է *ptl* գեների ենթակլոնավորում pUC19 բազմապատճեն պլազմիդի վրա:

MOLECULAR CLONING OF GENES OF PECTAT LYASE OF *ERWINIA CHRYSANTHEMI* IN THE CELLS OF *ESCHERICHIA COLI*

N. O. BUKANOV, M. YU. FONSTEIN, A. I. KARASIN, O. A. TOLMACHEV,

[S. I. ALIKHANIAN], N. K. YANKOVSKY

The genes of excreted protein pectat lyase (*ptl*) of *Erwinia chrysanthemi* ENA 49 were cloned in *Escherichia coli* cells on the phage vector λ47.1 and on the plasmid vector. 10 hybrid phages were identified in the population of BamHI, EcoRI and SalI fragments of ENA49 chromosomal DNA on λ47.1 and 45 *Ptl*⁺ hybrid phages were constructed on plasmid vector. Southern blot analysis was used for the localization of *ptl*⁺ genes on ENA49 chromosomal DNA.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Буканов Н. О., Фомштейн М. Ю., Евтушенков А. Н., Соаринский М. А., Стрельченко П. П., Янковский Н. К., Алиханян С. Н., Фомичев Ю. К., Дебабов В. Г. Генетика, 21, 1985.
2. Евтушенков А. Н., Прокулевич В. А., Белясова Н. А., Попова Л. Б., Фомичев Ю. К. Мол. генетика, микробиология и вирусология, 6, 11—15, 1984.
3. Birnholm H. C. Methods Enzymol., 100, 243—255, 1983.
4. Chatterjee A. K., Buchanan G. E., Behrens M. K., Starr M. P. Can. J. Microbiol., 25, 94—102, 1979.
5. Collmer A., Berman P., Mount M. S. In: Phytopathogenic prokaryotes. Mount M., Lacy G. (eds.), Academic Press, Inc NY., 1, 395—422, 1982.
6. Dente L., Cesareni G., Cortese R. Nucl. Acids Res., 11, 1645—1655, 1983.
7. Garlbaldi A., Bateman D. F. Physiol. Plant Pathol., 1, 25—40, 1971.
8. van Gijsegem F., Toussaint A., Schoonejans E. EMBO J., 4, 787—792, 1985.
9. Hohn B. Methods Enzymol., 68, 299—309, 1979.
10. Loenen W. A. M., Brammar W. J. Gene, 10, 249—259, 1980.
11. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 72, 1184—1188, 1975.
12. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
13. Marmur J. J. Mol. Biol., 3, 208—218, 1961.
14. Morrison D. A. J. Bacteriol., 132, 349—351, 1977.
15. Pupillo P., Mazzucchi U., Pierini G. Physiol. Plant Pathol., 9, 113—120, 1976.
16. Rombouts F. M., Pilnik W. Microb. Enzymes and Biocouvers, London, 5, 227—282, 1980.
17. Smitk G. E., Summers M. D. Anal. Biochem., 109, 123—129, 1980.
18. Vieira J., Messing J. Gene, 19, 259—268, 1982.
19. Keen N. T., Dahlbeck D., Staskawitz B., Belser W. Bacteriol., 159, 825—831, 1984.

«Биолог. Армения», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 377.19:579.83

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЮРИЦИНОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ШТАММАМИ *BACILLUS THURINGIENSIS*

А. С. ОВСЕПЯН, Б. П. КАРАБЕКОВ

Показано, что 42 штамма *B. thuringiensis* (из 100 проверенных), относящихся к 10 вариантам, продуцируют тюринины. 9 проверенных штаммов варианта *dendrolinea* не продуцируют и сами чувствительны ко всем тюрининам. Синтезируемые бактерицины чувствительны к трипсину, но различаются по чувствительности к высокой температуре, способности проходить через целлофановую мембрану, морфологии зон торможения индикаторного штамма, спектру действия. Получены моно- и полирезистентные мутанты универсального индикаторного (чувствительного ко всем тюрининам) штамма *B. thuringiensis* var. *galleriae* P10/14. Используя эти мутанты, тюринины распределены на 4 типа.

Ключевые слова: бактерициногенная *B. thuringiensis*, тюринины.

Представители различных серотипов вида *B. thuringiensis* продуцируют бактерицины, так называемые тюринины [1, 6, 7, 9]. Имеются