

УДК 575.083.13:576.851.48:577.21

КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВЫХ ВЕКТОРОВ С ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ХОЗЯЕВ

П. ДОБРОВОЛЬСКИ, В. И. УГАРОВ, В. А. САКАНЯН, С. И. АЛИХАНИЯН

С помощью *in vitro* мутагенеза плазмидной ДНК бисульфитом натрия получен делеционный мутант плазмиды RP4. Мутантная плаزمида рPD6 (8,4 ко) утратила гены *trfB*, *incC*, *incD*, все *kil* и *kor* гены (потеря гена *korB* неопределенна), но сохранила участки *oriV* и *trfA* с прилежащими последовательностями ДНК. Плазмида рPD6 детерминирует устойчивость к тетрациклину, имеет по крайней мере три рестрикционных сайта, пригодных для клонирования ДНК. Мутант рPD6 мобилизуется в гомологичные и гетерологичные грамотрицательные бактерии. Клонированием *Sau3A* фрагмента ДНК RP4 по *Bgl*III сайту вектора рPD6 сконструирован другой вектор рPD724, характеризующийся более высокой эффективностью мобилизационного переноса в гомологичные и гетерологичные реципиентные бактерии.

Ключевые слова: вектор, плазмида с широким спектром хозяев, *in vitro* мутагенез, делеция, мобилизация плазмид.

Возможность клонирования чужеродных генов в иных, чем *Escherichia coli*, микроорганизмах ограничена из-за отсутствия удобных векторов. Это ограничение может быть преодолено использованием векторов, имеющих широкий спектр бактериальных хозяев. Плазмиды RP4 (или RK2) из Р группы несовместимости характеризуется способностью переноситься конъюгацией и наследоваться в неродственных грамотрицательных бактериях [6, 14]. Эта плазмиды имеет уникальные сайты расщепления для рестриктаз, широко используемых в генной инженерии [13]. Однако из-за большого молекулярного веса (56,4 ко) она не находит применения в качестве вектора. Несцепленный характер локализации генов *trfA*, *trfB* и *oriV*, участвующих в репликации плазмидной ДНК [15, 20] и четырех пар генов *kil* и *kor*, влияющих на жизнеспособность клетки-хозяина [9, 18], затрудняет получение низкомолекулярных производных плазмиды RP4. Нами получен небольшой по размеру мутант, который сохраняет характерную для плазмиды RP4 способность к наследованию в гетерологичных грамотрицательных бактериях. Мутантная плазмиды и ее производные могут быть рекомендованы в качестве векторов для молекулярного клонирования ДНК.

Материал и методика. В работе использовали следующие штаммы: *E. coli* K-12 G600 (F^- *thrI leuB6 thiI lacY1 tonA21 supE44*) и полученный из него спонтанный *gal*⁺ мутант; *E. coli* HB101 (F^- *proA2 leu thi ara14 xy15 mtlI galK2 lacY1 recA13 rpsL20 hsd hsm supE44*), *Pseudomonas aeruginosa* PA08 Pu21 (*met28 liv202 strI rif*), *Agrobacterium tumefaciens* PC2549 (*trf Ti*⁻), *Pseudomonas putida* (cm1).

Использовали плазмиды RP4—*IncP Ap^r Km^r Tc^r*, pRP401—*IncP Ap^r Tc^r*, R751—*IncP Tr^r* и pBR322—*Ap^r Tc^r* из лабораторной коллекции, а также плазмиды pRK2013—*Km^r tra⁺_{RP4} rep⁺_{ColE1}* и pRK290—*IncP Tc^r oriT⁺_{RP2}* [8], полученные от д-ра

А. Кондорони (Венгрия). Мутагенез плазмиды pRP401 бисульфитом натрия проводили по следующей схеме. К трем объемам свежеприготовленного на холоду 4 М раствора NaHSO_3 (рН 6,0) добавляли 1 объем расщепленной рестриктазой BamHI ДНК pRP401 (50 мкг/мл) и 0,04 объема 50 мМ раствора гидрохинона. Для исключения доступа кислорода на реакционную смесь наносили тонкий слой вазелинового масла и в таком виде суспензию инкубировали при 37° в течение 16 часов. Путем последовательных диализов из реакционной смеси удаляли мутаген [17]. Мутагенизированную ДНК после обработки полинуклеотид-лигазой фяга T4 использовали для трансформации штамма *E. coli* K-12 C600.

Мобилизацию неконъюгативных плазмид с помощью плазмиды pRK2013 проводили скрещиванием «двойных доноров» с соответствующими реципиентами. Культуры донора и реципиента, выращенные до экспоненциальной фазы роста, смешивали в отношении 1:1 и наносили на нитроцеллюлезные фильтры (Schleicher & Schull, BA85, 25 мм), которые инкубировали на поверхности L-агара в течение 20 ч при температуре, оптимальной для данного реципиента: 37° для *E. coli*, 42°—для *P. aeruginosa* и 30°—для *P. putida* и *A. tumefaciens*. Бактерии смывали с фильтров физиологическим раствором и высевали на селективные среды. Частоту переноса плазмид определяли как соотношение числа трансконъюгантов к числу донорных клеток.

Остальные методики описаны ранее [1, 2, 4].

Результаты и обсуждение. Исходной молекулой для генерирования делеций в геноме RP4 служил гибрид pAS8, полученный соединением ДНК RP4 и ColE1 по сайту EcoRI [5]. Из плазмиды pAS8 методом «P22—трансдукционного укорачивания» в клетках *Salmonella typhimurium* LT2 получен неконъюгативный мутант pAS9 [3], из которого обработкой рестриктазой EcoRI удален ColE1-фактор и получена плаزمида pRP401 [1]. Карта этой плазмиды представлена на рис. 1. Попытки получения у плазмиды pRP401 сколько-нибудь заметных делеций с помощью различных рестриктаз, без изменения естественного порядка расположения существенных генов, оказались безуспешными. Для преодоления этого ограничения привлечен метод *in vitro* мутагенеза плазмиды pRP401 с помощью бисульфита натрия. Среди проверенных 350 устойчивых к тетрациклину колоний, выросших в результате трансформации мутагенизированной ДНК, обнаружен один клон, не приобретший признака устойчивости к ампициллину. В контрольном эксперименте, когда расщепленная рестриктазой BamHI ДНК pRP401 не обрабатывалась мутагеном, среди более чем 1000 проверенных Tc^r трансформантов не обнаружено ни одного, чувствительного к ампициллину.

Плазмидную ДНК, выделенную из $\text{Tc}^r \text{Ar}^s$ клона, анализировали с помощью различных рестриктаз. Оказалось, что плазмиды, обозначенная как pPD6, утратила сайты расщепления для рестриктаз BamHI, PstI, KpnI, XhoI и EcoRI, но сохранила по одному сайту для ферментов BglII и SalGI, а также по два сайта для ферментов SstII и SmaI. Молекулярная длина плазмиды pPD6 составляет около 8,4 ко. Из карты плазмиды pPD6 (рис. 1), видно, что она утратила протяженный район ДНК родительской плазмиды pRP401, охватывающий гены *trfB*, все *kil* и *koq* гены, за исключением, возможно, гена *koqB*.

Плазмиды pPD6 утратила участки ДНК с координатами 2,1—4,6 ко и 54,1—56,4 ко, которые, наряду с районом *oriV*, ответственны за проявление свойств несовместимости [12, 15, 19, 21]. Из данных табл. 1

ginosa PA08 Pu21, *P. putida* и *A. tumefaciens* PC2549 отбором транс-конъюгантов на полноценной среде с тетрациклином и антибиотиком, соответствующим характеру устойчивости реципиентного штамма. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 2. Как видно, плазида pPD6 с частотой, сравнимой с частотой плазмиды pRP401, мобилизуется в гомологичную и гетерологичные бактерии. Эта частота в 6—150 раз (в зависимости от реципиента) ниже частоты мобилизации $oriT^+$ плазмиды pRK290.

Для повышения частоты мобилизационного переноса плазмиды pPD6 на ней отклонирован mob^+ участок плазмиды RP4. Для этого обработанную рестриктазой *Eg*III и щелочной фосфатазой ДНК pPD6 сшивали с ДНК плазмиды RP4, расщепленной одновременно рестриктазами *Sau*3A и *Sal*I (обработка второй рестриктазой преследовала цель облегчить последующий отбор нужных рекомбинантных плазмид, так как при этом инактивируется ген *tet* плазмиды RP4). Выросшие Tc^r трансформанты штамма *E. coli* HB101 проверяли на способность к повышенному мобилизационному переносу в реципиентный штамм *E. coli* K-12 C600 nal^r . Для этого культуру Tc^r трансформантов смешивали со штаммами *E. coli* HB101 (pRK2013) и *E. coli* K-12 C600 nal^r и после четырех часов инкубации при 37° (в этот период эффективность мобилизации плазмиды pPD6, в отличие от плазмиды pRK290, очень низкая) суспензию клеток высевали на полноценную среду с тетрациклином и палидиксовой кислотой.

Среди проверенных 170 клонов отобрано 3 клон с повышенной частотой мобилизации Tc^r признака плазмидной ДНК. Рестрикционный анализ плазмид из этих клонов показал, что все они приобрели вставки разной длины, наименьшая из которых равна 1,6 ко. Плазида с этой вставкой, обозначенная как pPD724, имеет уникальные сайты для фермента *Sal*I и по два сайта для ферментов *Sma*I и *Sst*II. Эта плазида мобилизуется в гомологичные и гетерологичные бактерии со сравнимой с плазмидой pRK290 частотой (табл. 2).

Таблица 2
Частота мобилизационного переноса неконкюгативных плазмид с помощью плазмиды pRK2013 в грамотрицательные бактерии

Двойной донор <i>E. coli</i> HB101	Частота мобилизации (по Tc^r признаку) плазмид в реципиентные штаммы:			
	<i>E. coli</i> K-12 C600 nal^r	<i>P. aeruginosa</i> PA08 Pu21	<i>P. putida</i>	<i>A. tumefaciens</i> PC2549
pRK2013/pRP401	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$
pRK2013/pPD6	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-6}$
pRK2013/pPD724	1	$8,5 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
pRK2013/pRK290	1	$2,0 \cdot 10^{-1}$	не опред.	$1,8 \cdot 10^{-5}$

Определяли также стабильность плазмид в штаммах *E. coli* и *P. aeruginosa* в условиях роста клеток без селективного давления (рис. 2). В отличие от плазмиды pRP401, плазида pPD6 характеризуется нестабильностью—по прошествии 40 генераций доля клеток *E. coli* и *P. aeruginosa*, сохранивших плазмиду pPD6, составляет около 70 и 50% соответственно. Во всех анализированных Tc^r клонах, приобретших плазмиду pPD6, уже в нулевой точке кривой сегрегации имеются бес-

плазмидные клетки. Плазмида rPD724 как в клетках *E. coli*, так и *P. aeruginosa* проявляет такую же нестабильность, как и плазмида rPD6.

Плазмида rPD6 величиной всего 8,4 ко является самым маленьким функциональным репликоном, полученным из плазмиды RP4 при условии сохранения без изменения области репликационных генов. Плаз-

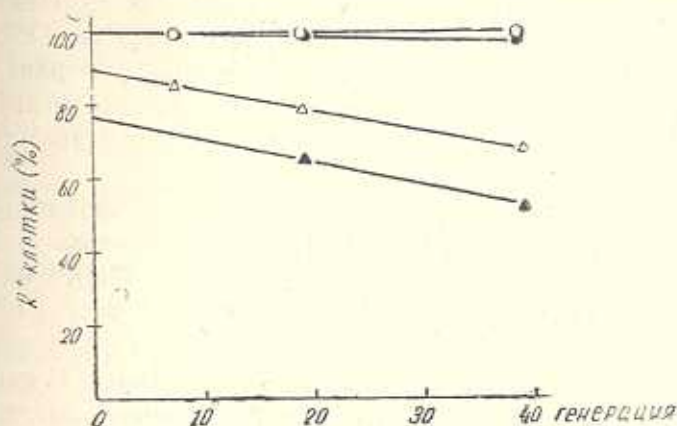


Рис. 2. Кинетика сегрегации плазмид rRP401 (○, ●) и rPD6 (△, ▲) в клетках штаммов *E. coli* K-12 C600 (○, △) и *P. aeruginosa* PA08 Pa21 (●, ▲).

мида rPD6 утратила гены *trfB*, *incC*, *incD* и, возможно, все гены *kil* и *kor* (присутствие гена *korB* в плазмиде rPD6 под сомнением). Плазмида rPD6 по свойствам репликации и несовместимости не отличается от плазмиды rRP401. Более того, она реплицируется в филогенетически удаленных от *E. coli* бактериях. Эти данные согласуются с результатами других авторов, показавших, что для репликации мини-производных плазмиды RK2 не нужен ген *trfB* и что детерминированная участками *oriV* и *trfA* информация достаточна для наследования плазмидной ДНК в гетерологичных бактериях [16].

Мутант rPD6, в отличие от плазмиды rRP401, проявляет сегрегационную нестабильность в клетках *E. coli* и *P. aeruginosa*. Это позволяет предположить, что какой-то из утраченных генов или пока неидентифицированных участков ДНК rRP401 вовлечен в распределение плазмидных реплик в дочерние клетки или в иной механизм стабильного наследования генома RP4.

Плазмида rPD6 может быть перенесена в бактерии путем трансформации и конъюгации. Сохранение ее мобилизационной активности подтверждает ранее сделанное предположение о возможности переноса *oriT*-плазмиды rRP401 с помощью конъюгативных плазмид [2]. В использованных условиях плазмиды rRP401 и rPD6 мобилизуются в разные бактерии всего в 6—150 раз хуже, чем плазмида rRK290, содержащая сайт *oriT* [7, 10]. Следовательно, *oriT* не является единственным сайтом, инициирующим мобилизационный перенос неконъюгативных производных плазмиды RP4 (или RK2). Так как частота переноса плазмид rRP401 и rPD6 одинакова, то предполагаемый «вторичный» сайт мобилизации должен находиться в пределах генома rPD6.

Пониженная частота мобилизации плазмиды pPD6 в определенных условиях может ограничить эффективность манипуляции с ней как с вектором. Поэтому на ней отклонирован Sau3A фрагмент ДНК RP4, обеспечивающий высокую частоту переноса. Сконструированная плаزمида pPD724 мобилизуется с такой же эффективностью, как плаزمида pRK290, что позволяет предположить присутствие в клонированном фрагменте ДНК размером 1,6 ко сайта oriT. Известно, что функциональный oriT находится во фрагменте ДНК RK2 размером не более 760 пар оснований [11]. У нас пока нет прямых доказательств о наличии в клонированном фрагменте плазмиды pPD724 сайта oriT, поэтому природа этого mob⁺ фрагмента еще требует выяснения.

Таким образом, сконструированные в настоящей работе небольшие по размеру плазмиды pPD6 и pPD724 могут быть использованы в качестве векторов для молекулярного клонирования ДНК (по крайней мере по сайтам BglII, SalI и SmaI у pPD6 и SalI и SmaI у pPD724) в грамотрицательных бактериях с разработанной методикой трансформации и как челночные векторы для клонирования генов в E. coli с последующим мобилизационным переносом рекомбинантных молекул в оптимальные бактериальные хозяева.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва,

Научно-исследовательский технологический
институт аминокислот, Ереван

Поступило 6.III 1985 г.

ՏԵՐԵՐԻ ԼԱՅՆ ՍՊԵԿՏՐՈՎ ՆՈՐ ՎԵԿՏՈՐՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՅՑՈՒՄԸ

Պ. ԿՈՐՐՈՎՈՒՄԻ, Վ. Ի. ՈՒԳԱՐՈՎ, Վ. Ա. ՍԱԿԱՆՅԱՆ, Ս. Ի. ԱԼԻԿՅԱՆ

Ստացվել է RP4 պլազմիդի դելեցիոն մուտանտը՝ պլազմիդային ԳնԹ-ի ձմերթաթթվային Na-ով *in vitro* մուտագենեզի օգնությամբ: Ստացված pPD6 մուտանտը (8,4կբ) կորցրել է *trfB*, *incC*, *incD* գեները, բոլոր *kil* և *kor* գեները, բացառությամբ, հավանաբար, *korB* գենի, բայց պահպանել է *oriV* և *trfA* գեները: pPD6 պլազմիդը պայմանավորում է կայունությունը տեսրացիկներին նկատմամբ, ունի ԳնԹ-ի կրոնավորման համար պիտանի առնվազն երեք ռեսուրսները սայտ: pPD6 պլազմիդը մորթիլիզացվում է հոմոլոգ և հետերոլոգ բակտերիաների մեջ: RP4 ԳնԹ-ի Sau3A ֆրագմենտի կրոնավորմամբ ըստ վեկտորի BglII սայտի, կառուցվել է մեկ այլ վեկտոր՝ pPD724, որը բնութագրվում է հոմոլոգ և հետերոլոգ բակտերիաների մեջ մորթիլիզացման ավելի բարձր հաճախականությամբ:

CONSTRUCTION OF NEW BROAD HOST RANGE VECTORS

P. DOBROVOLSKI, V. I. UGAROV, V. A. SAKANYAN, S. I. ALIKHANIAN

Deletion mutant of RP4 plasmid has been obtained using *in vitro* mutagenesis of plasmid DNA by sodium bisulphite. Mutant plasmid

pPD6 (8,4 kb) has lost the genes *trf B*, *inc C*, *inc D*, all of the *kil* and *kor* genes, except, probably of *kor B* gene, but has retained the genes *oriV* and *trf A* with neighbouring sequences of DNA. The plasmid *pPD6* determines the resistance to tetracycline and has at least three cleavage sites useful for DNA cloning. The plasmid *pPD6* is mobilizable by conjugative plasmid *pRK2013* to homologous and heterologous gram-negative bacteria. Another high-mobilizable vector *pPD724* has been constructed as well by cloning *mob⁺ Sau3A* fragment of *RP4* DNA into the *BglII* site of *pPD6* plasmid.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Рябченко Л. Е., Добровольски П., Саканян В. А. Генетика, 18, 1453—1461, 1982.
2. Рябченко Л. Е., Саканян В. А., Чернышева И. П., Добровольски П., Алиханян С. И. Генетика, 20, 1594—1606, 1984.
3. Саканян В. А., Алиханян С. И., Якубов Л. З., Степанов А. Н. Генетика 13, 1778—1789, 1977.
4. Саканян В. А., Крупенко М. А., Рябченко Л. Е., Пермогоров В. И., Алиханян С. И. Генетика, 15, 972—988, 1979.
5. Степанов А. Н., Зимица М. С., Якубов Л. З., Рабинович П. М., Бебуров М. Ю. Генетика, 13, 1790—1800, 1977.
6. Datta N., Hedges R. W. J. Gen. Microbiol., 70, 453—460, 1972.
7. Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7347—7351, 1980.
8. Figurski D. H., Helinski D. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1648—1652, 1979.
9. Figurski D. H., Pohlman R. F., Bechhofer D. H., Prince A. S., Kelton C. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1935—1939, 1982.
10. Guiney D. G., Helinski D. R. Mol. Gen. Genet., 172, 183—189, 1979.
11. Guiney D. G., Jakobson E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3595—3598, 1983.
12. Meyer R., Hinds M. J. Bacteriol., 152, 1078—1090, 1982.
13. Meyer R., Figurski D., Helinski D. R. Mol. Gen. Genet., 152, 129—135, 1977.
14. Olsen R. H., Shipley P. J. Bacteriol., 113, 772—780, 1973.
15. Sakanyan V. A., Yakubov L. Z., Alkhanian S. I., Stepanov A. I. Mol. Gen. Genet., 165, 331—341, 1978.
16. Schmidhauser T. J., Filutowicz M., Helinski D. R. Plasmid, 9, 325—330, 1983.
17. Shortle D., Nathans D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2170—2174, 1978.
18. Smith C. A., Thomas C. M. Mol. Gen. Genet., 190, 245—254, 1983.
19. Smith C. A., Thomas C. M. J. Gen. Microbiol., 130, 1651—1663, 1984.
20. Thomas C. M., Meyer R., Helinski D. R. J. Bacteriol., 141, 213—222, 1980.
21. Thomas C. M., Stalker D. M., Helinski D. R. Mol. Gen. Genet., 181, 1—7, 1981.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 6, 1985

УДК 577.352

МОДИФИКАЦИЯ БИСЛОЙНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПРОПОЛИСОМ

А. Е. ЗАКАРЯН, Г. А. ПОГОСЯН

Показано влияние водо- и спирторастворимых компонентов прополиса на электропроводность искусственных бислойных липидных мембран, сформированных из общих фосфолипидов мозга. Падение электрического сопротивления БЛМ более чем на 3—4 порядка объясняется присутствием в мембраноомывающем растворе низкомолекулярных компонентов этого вещества.

Ключевые слова: прополис, БЛМ, электропроводность.