



УДК 547.963.32+577.23

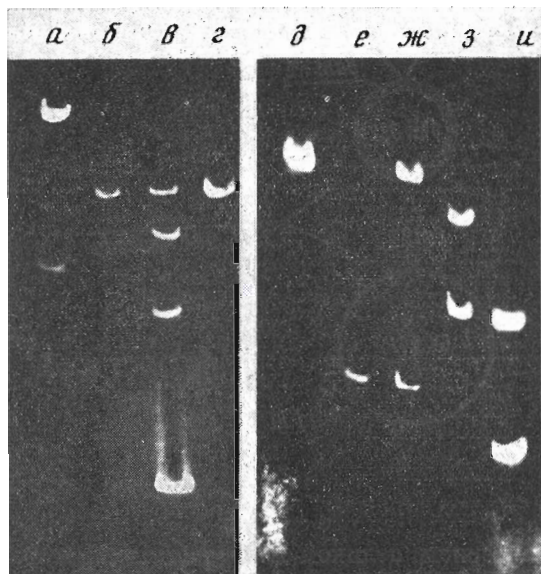
ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ ПЛАЗМИД  
С ДВУМЯ РЕПЛИКОНАМИ *ColE1*Берлин Ю. А., Лебедева Е. Н., Шпаковский Г. В.,  
Боротков К. О.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Методом рекомбинации *in vitro* из плазмид рBR322 ( $Ap^rTc^r$ ) и СКΔ11 ( $Km^r$ ) получены гибридные плазмиды рBR322/*EcoRI*–СКΔ11/*EcoRI* (рLCG1) и рBR322/*HindIII*–СКΔ11/*HindIII* (рLCG2); с помощью рестрикционного анализа установлена взаимная ориентация обоих фрагментов в рLCG1. Фенотипические характеристики гибридных плазмид (соответственно  $Ap^rTc^rKm^r$  и  $Ap^rTc^sKm^r$ ) показывают, что рестриктаза *EcoRI* не затрагивает детерминантов устойчивости к антибиотикам у обеих исходных плазмид, а *HindIII*, оставляя неизменными участки  $Km^r$  у СКΔ11 и  $Ap^r$  у рBR322, инактивирует участок  $Tc^r$  у рBR322. Плазида рLCG1 может быть использована в качестве клонирующего вектора (по *VamHI*-сайту); отбор рекомбинантов основывается на фенотипическом переходе  $Ap^rTc^rKm^r \rightarrow Ap^rTc^sKm^r$ .

При структурном и функциональном изучении нуклеиновых кислот в качестве векторов для клонирования и амплификации ДНК широко используются производные многокопийной колициногенной плазмиды *ColE1*, репликация которых находится под ослабленным контролем клетки и которые содержат детерминанты устойчивости к различным антибиотикам, служащие маркерами при отборе рекомбинантов [1]. Одно из таких производных, плазида рBR322, несет детерминанты устойчивости к ампициллину и тетрациклину и содержит несколько уникальных участков узнавания эндонуклеаз рестрикции (главным образом в  $Tc^r$ -области), пригодных для встраивания чужеродной ДНК [2].

Изучая влияние таких вставок на фенотип образующихся рекомбинантов, мы, чтобы упростить последующую селекцию, использовали в качестве второго компонента рекомбинации *in vitro* ДНК с характерным фенотипическим выражением — плазмиду СКΔ11, которая вызывает устойчивость к антибиотику канамицину и, подобно рBR322, содержит репликон *ColE1* [3]. Эти плазмиды расщепляли рестриктазой *EcoRI* и образовавшиеся линейные ДНК сшивали ДНК-лигазой в два этапа — сначала при более высокой концентрации ДНК, благоприятствующей межмолекулярной сшивке, а затем при более низкой концентрации, способствующей замыканию в кольцевые молекулы [4, 5]. Полученной смесью продуктов лигирования трансформировали клетки безрестриктазного штамма *E. coli*, отбирая трансформанты, устойчивые к тетрациклину, ампициллину и канамицину. Первичный анализ  $Ap^rTc^rKm^r$ -клонов проводили с помощью гель-электрофореза лизатов отдельных колоний [6]; о наличии в лизате рекомбинантной ДНК судили по появлению на электрофореграмме полосы ДНК с меньшей

Рис. 1. Электрофорез ДНК в 1% агарозном геле (направленные движения веществ сверху вниз): а — pLCG1, б — pLCG1/*Bam* HI, в — pLCG1/*Bam* HI (верхняя полоса) и смесь маркеров (сверху вниз: pRSF2124/*Eco* RI, СКΔ11/*Eco* RI, pBR322/*Eco* RI), г — то же, что б, но из другого клона, д — СКΔ11/*Eco* RI, е — pBR322/*Eco* RI, ж — pLCG1/*Eco* RI, з — pLCG1/*Hind* III, и — СКΔ11/*Eco* RI + *Hind* III)



подвижностью, чем у pBR322 и СКΔ11. Из нескольких отобранных таким образом клонов была выделена ДНК, которая затем была гидролизована рестриктазой *Eco*RI. Как показал гель-электрофорез продуктов гидролиза, часть полученных клонов действительно содержит рекомбинантные молекулы ДНК pBR322/*Eco*RI—СКΔ11/*Eco*RI (эту химерную плазмиду мы обозначили pLCG1), которые расщепляются *Eco*RI с образованием линейных форм исходных плазмид pBR322 и СКΔ11 (рис. 1). Трансформация *E. coli* препаратами ДНК pLCG1 свидетельствует о том, что эта плазида передает бактериальным клеткам фенотипические характеристики выделенных клонов (*Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>*) и, таким образом, действительно содержит детерминанты устойчивости к ампициллину, тетрациклину и канамицину.

Поскольку ДНК СКΔ11, в отличие от pBR322, не содержит сайтов рестриктазы *Bam*HI, то с помощью этой эндонуклеазы химерная плазида pLCG1 была превращена в линейную форму для определения молекулярного веса с помощью гель-электрофореза; в качестве стандартов при этом использовали полученные с помощью *Eco*RI линейные формы ДНК плазмид pRSF2124 ( $M\ 7,3 \cdot 10^6$ ) [7], СКΔ11 ( $M\ 5,6 \cdot 10^6$ , определено нами с помощью электронной микроскопии, рис. 2; ср. [3]) и pBR322 ( $M\ 2,6 \cdot 10^6$ ) [2] (см. рис. 1). В результате для pLCG1 была определена величина  $M\ 8,1-8,2 \cdot 10^6$ , что согласуется с нашими электрономикроскопическими данными ( $8,3 \cdot 10^6$ , рис. 2) и показывает, что pLCG1 содержит по одной молекуле pBR322 и СКΔ11.

Аналогично, с помощью рестриктазы *Hind*III была получена гибридная плазида pBR322/*Hind*III—СКΔ11/*Hind*III (pLCG2), изомерная плазмиде pLCG1. Она сохраняет способность исходных плазмид переносить устойчивость к ампициллину и канамицину, но не к тетрациклину. Это означает, что *Eco*RI не затрагивает детерминантов устойчивости у обеих исходных плазмид, а *Hind*III инактивирует участок *Tc<sup>r</sup>* у pBR322, оставляя неизменными участки *Ap<sup>r</sup>* у pBR322 (ср. [2]) и *Km<sup>r</sup>* у СКΔ11\*.

При расщеплении ДНК СКΔ11 рестриктазами *Hind*III и *Eco*RI (рис. 1) были получены два фрагмента с  $M\ 3,5 \cdot 10^6$  и  $2,1 \cdot 10^6$  (один из этих фрагмен-

\* Сохранение устойчивости к канамицину после обработки *Hind*III отличает *Km<sup>r</sup>*-детерминант плазмиды СКΔ11 от аналогичного детерминанта, извлеченного из плазмиды R6 и ранее использованного для конструирования ряда гибридных плазмид [8].

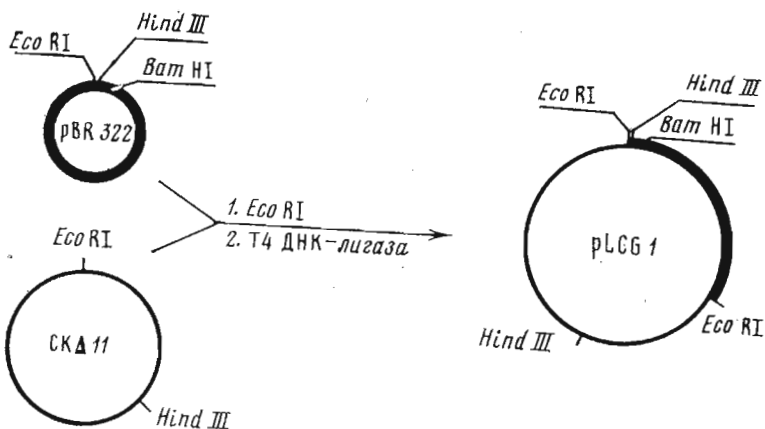


Рис. 3. Получение плазмиды pLCG1

тов содержит целиком  $Km^r$ -участок). Расстояние между сайтами *Eco*RI и *Hind*III в pBR322 незначительно (29 нуклеотидных пар) [9], поэтому при действии *Hind*III на pLCG1 один из двух образующихся фрагментов должен быть близок по размерам к одному фрагменту SKΔ11 (*Eco*RI+*Hind*III), а другой — к сумме pBR322 и второго фрагмента SKΔ11. Величины молекулярного веса, найденные для фрагментов pLCG1/*Hind*III ( $4,6 \cdot 10^6$  и  $3,7 \cdot 10^6$ ; рис. 1), отвечают взаимной ориентации плазмидных компонентов в pLCG1, изображенной на рис. 3.

Для встраивания чужеродной ДНК в плазмиду pLCG1 пригоден сайт *Vam*HI; в этом случае селекция клонов основывается на фенотипическом переходе  $Ap^rTc^rKm^r \rightarrow Ap^rTc^sKm^r$ . Чужеродную ДНК можно встроить по сайту *Vam*HI и в плазмиду pLCG2, но при этом  $Ap^rTc^sKm^r$ -фенотип плазмиды не изменяется, что затрудняет отбор рекомбинантов. Гибридная плаزمида pLCG1 сохраняет такие свойства исходных плазмид, как многокопийность и способность амплифицироваться в присутствии хлорамфеникола, благодаря чему она может использоваться в качестве клонирующего вектора, содержащего три маркера-детерминанта устойчивости к антибиотикам.

### Экспериментальная часть

Штаммы *E. coli* NM182 (продуцент *Eco*RI), *E. coli* C600 (SKΔ11) и *E. coli* C600 (pRSF2124) были получены от В. Г. Дебабова (ВНИИ Генетика), *E. coli* C600 (pBR322) — от П. Курильски (Институт Пастера), *E. coli* MM294 (pMB9) — от К. Г. Скрябина, *B. amyloliquefaciens* — от П. М. Чумакова (ИМБ АН СССР). Использовали трис, сахарозу (Merck), EDTA, SDS (Serva), хлорамфеникол, дитиотреит, АТФ (Calbiochem), тетрациклин, канамицин, ампициллин (Минмедпром СССР), лизоцим (P-L Biochemicals), агарозу (BioRad, Calbiochem), бромистый этидий, бромфеноловый синий,  $MgCl_2$  (Sigma), дрожжевой экстракт, триптон, агар (Difco).

Эндонуклеазу *Eco*RI выделяли по методу [10], *Hind*III и *Vam*HI — по методикам Р. Робертса, Т4 ДНК-лигазу — по методу [11], плазмидную ДНК — по методу [12] или по модифицированному методу [13], трансформацию бактериальных клеток плазмидными ДНК проводили по методу [14], используя в качестве реципиента *E. coli* MM294. Бактериальные культуры, несущие плазмиды, выращивали в присутствии соответствующих антибиотиков в концентрации 20 (тетрациклин), 30 (канамицин) или 100–150 мг/л (ампициллин). Бактериальные клоны анализировали на наличие гибридных плазмид по методу [6].

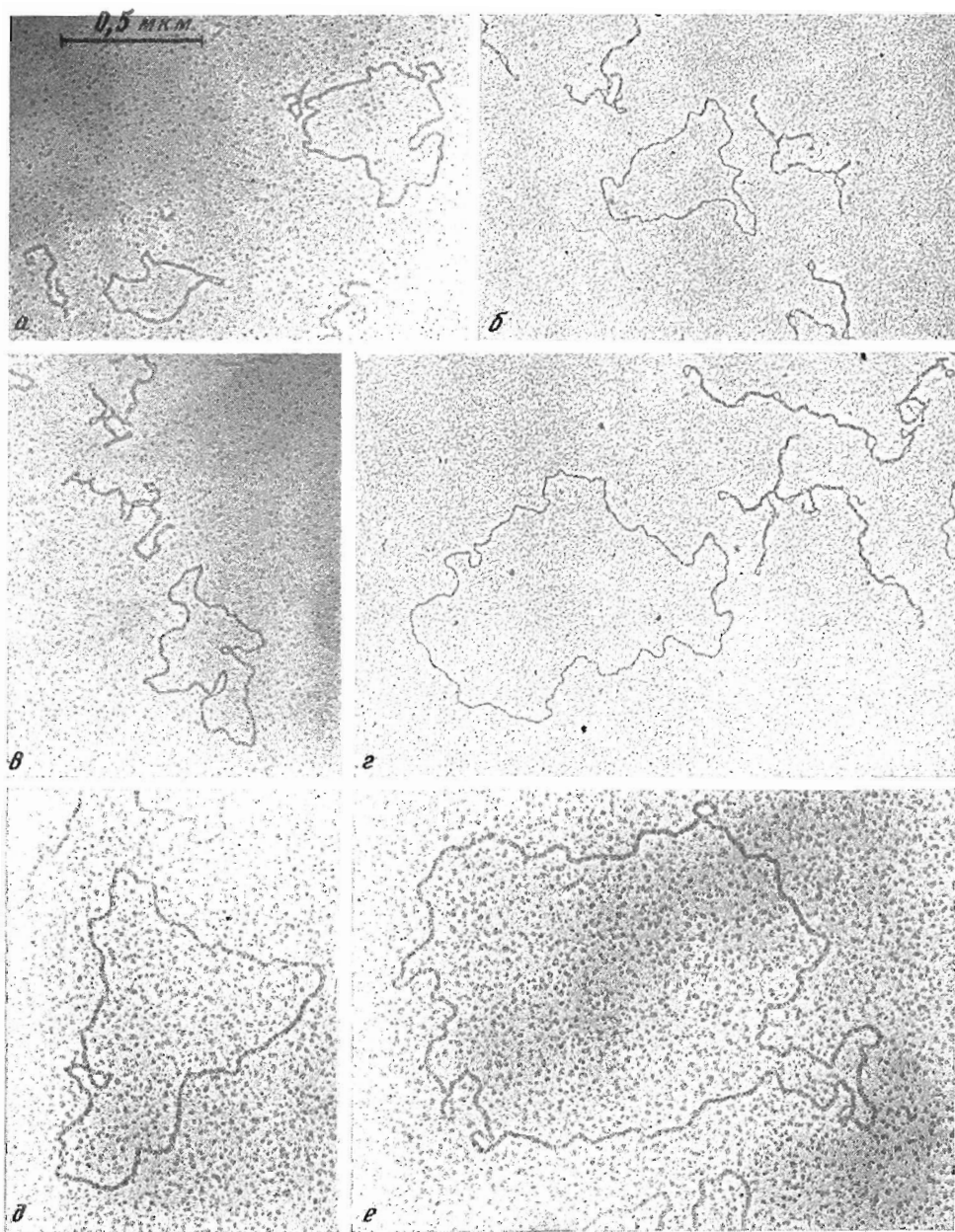


Рис. 2. Электронные микрофотографии плазмидных ДНК (открытые кольца; увеличение  $\times 25\,000$ ; ДНК рBR322 в качестве внутреннего стандарта): а – рBR322 и ее димер, б – рMB9, в – СКΔ11, г – рRSF2124, д – рLCG1, е – димер рLCG1

Электрофорез ДНК проводили в пластинах (0,2×15×20 см) 1% агарозного геля в трис-ацетатном буфере (40 мМ трис, 20 мМ Na-ацетат, 1 мМ Na<sub>2</sub>-EDTA, 18 мМ NaCl, pH 8,0) при напряжении 7–10 В/см; в качестве маркера использовали бромфеноловый синий. Гель выдерживали 15 мин в водном растворе бромистого этидия (1 мг/л), промывали водой и фотографировали на фотопленку Микрат-300 с красным светофильтром при освещении светом с λ 254 и 366 нм. Электронные микрофотографии плазмидных ДНК получены с помощью микроскопа JEM-100C; образцы приготовлены по водному методу [17]; определения контурной длины ДНК СКΔ11 и pLCG1 контролировали параллельными определениями для известных плазмид pBR322, pMB9 и pRSF2124 (рис. 2).

*Получение плазмидных ДНК.* Культуру *E. coli* C600 (pBR322) выращивали при 37° на среде YT-M9 с глюкозой (состав, г/л: дрожжевой экстракт 5, триптон 8, глюкоза 2, NaCl 5, NH<sub>4</sub>Cl 1, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,015, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3, MgSO<sub>4</sub> 0,1), содержащей тетрациклин (20 мг/л) и ампициллин (150 мг/л). После достижения величины  $D_{550}$  0,6–0,8 (~5·10<sup>8</sup> клеток/мл) прилили спиртовой раствор хлорамфеникола (60 мг/мл) до конечной концентрации 170 мг/л и продолжали ферментацию в течение 12–16 ч. Последующие операции проводили при температуре от 0 до 4°. Клетки отделили центрифугированием (5000g, 20 мин), промывали TES-буфером (25 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,5 мМ EDTA, 0,14 М NaCl), а затем ST-буфером (25% раствор сахарозы (вес/объем) в 50 мМ трис-HCl, pH 8,0). Полученную биомассу (2–2,5 г/л) суспендировали в 10 мл ST-буфера, прибавили 2 мл раствора лизоцима в том же буфере (5 мг/мл), через 30 мин прибавили 2 мл 0,25 М EDTA (pH 8,0), еще через 5 мин — 2 мл 10% SDS, тщательно перемешали, прибавили 5 мл 5 М NaCl и оставили на 15 ч. Центрифугировали 1 ч при 48 000g, получили 15–20 мл осветленного лизата. В 13-мл центрифужную пробирку поместили 9,79 г CsCl и 4 мл TE-буфера (50 мМ трис-HCl, pH 7,4; 1 мМ EDTA), перемешали до максимального растворения CsCl, прилили 5 мл осветленного лизата, осторожно перемешали до полного растворения, прибавили 0,4 мл водного раствора бромистого этидия (10 мг/мл) и остальную часть пробирки заполнили раствором CsCl (d 1,60). Центрифугировали на роторе Ti-75 (центрифуга Spinco L5-65) в течение 26 ч при 62 000 об/мин, положение полос определяли по свечению в УФ-свете. Через верх пробирки собирали верхнюю зону, затем через боковой прокол — нижнюю зону, содержащую сверхскрученную кольцевую плазмидную ДНК. Бромистый этидий проэкстрагировали изоамиловым спиртом, раствор диализовали против TE-буфера и концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически (1 ОЕ<sub>260</sub> соответствует 50 мкг). Выход ДНК около 1 мг из 1 л культуральной жидкости.

Аналогично были получены ДНК плазмид pMB9 [15] и pRSF2124, а также гибридных плазмид pLCG1 и pLCG2; ДНК СКΔ11 выделяли по методу [12].

Гидролиз эндонуклеазами рестрикции проводили в пробе объемом 20 мкл, содержащей 1 мкг плазмидной ДНК, 1–2 ед. фермента, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ дитиотреит, а также 40 мМ трис-HCl, pH 7,4, и 50 мМ NaCl (*EcoRI*), 6 мМ трис-HCl, pH 7,4, и 50 мМ NaCl (*HindIII*), 10 мМ трис-HCl, pH 7,4 (*BamHI*). При расщеплении ДНК двумя эндонуклеазами сначала использовали ту из них, которая действует при меньшей концентрации NaCl и/или трис-HCl, затем доводили концентрацию соответствующего компонента до нужной величины и проводили гидролиз второй эндонуклеазой. Реакцию прекращали нагреванием при 65° в течение 5 мин, после чего прибавляли 2 мкл раствора бромфенолового синего в 50% сахарозе и проводили электрофорез или же полученную линейную форму плазмидной ДНК использовали для лигазных сшивок.

*Получение рекомбинантных плазмид pBR322 — СКΔ11 и трансформация ими клеток E. coli.* Реакционную смесь (50 мкл), содержащую линейные ДНК pBR322 (0,35 мкг) и СКΔ11 (0,7 мкг), 10 мМ трис-HCl, pH 7,6;

10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 50 мМ АТР и 20 ед. Т4 ДНК-лигазы [16], инкубировали 3 ч при 12°, разбавили буфером в 4 раза и инкубировали 18 ч при 0°. Полученный раствор добавлением 1 М CaCl<sub>2</sub> довели до концентрации CaCl<sub>2</sub> 30 мМ и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* MM294 [14] (~5·10<sup>8</sup> клеток в 0,1 мл 30 мМ CaCl<sub>2</sub>) \*. После инкубации при 0° (1 ч) и 42° (2 мин) суспензию разбавили 5 мл среды YT (дрожжевой экстракт 5, триптон 8, NaCl 5 г/л), инкубировали 1,5 ч при 37°, часть (0,1 мл) выселили на твердую среду (1,5% агар в среде YT), содержащую различные комбинации ампициллина, тетрациклина и канамицина, и инкубировали 24–48 ч при 37°.

Из полученных клонов (45 *Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>*-клонов для *EcoRI* и 22 *Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>* для *HindIII*) после анализа по методу [6] было отобрано по 4 клонa *E. coli* (pBR322/*EcoRI*—СКΔ11/*EcoRI*) и *E. coli* (pBR322/*HindIII*—СКΔ11/*HindIII*). Их выращивание, выделение плазмидных ДНК и трансформацию этими ДНК клеток *E. coli* проводили, как описано выше. Для pLCG1 число трансформантов на 1 мкг ДНК составило 8·10<sup>4</sup>, для pLCG2 — 2·10<sup>5</sup>.

Авторы благодарны Л. Г. Ждановой и И. М. Грубер за биомассу *H. influenzae*, М. А. Грачеву за биомассу *E. coli* В62 (Т4amN82), В. Г. Дебабову, П. Курильски, К. Г. Скрябину, П. М. Чумакову за штаммы микроорганизмов, Н. К. Янковскому за сообщение о длительном хранении компетентных клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hershfield V., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinski D. R. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3455—3459.
2. Bolivar F., Rodriguez R., Greene P. J., Betlach M., Heyneker H. L., Boyer H. W., Crosa J., Falkow S. (1977) Gene, 2, 95—113.
3. Kozlov J. I., Kalinina N. A., Gening L. V., Rebentish B. A., Strongin A. Y., Bogush V. G., Debabov V. G. (1977) Mol. gen. Genet., 150, 211—219.
4. Dugaiczuk A., Boyer H. W., Goodman H. M. (1975) J. Mol. Biol., 96, 171—184.
5. De Vries F. A. J., Collins C. J., Jackson D. A. (1976) Biochim. et biophys. acta, 435, 213—227.
6. Barnes W. M. (1977) Science, 195, 393—394.
7. So M., Gill R., Falkow S. (1975) Mol. gen. Genet., 142, 239—249.
8. Armstrong K. A., Hershfield V., Helinski D. R. (1977) Science, 196, 172—174.
9. Rodriguez R. L., Tait R., Shine F., Bolivar F., Heyneker H., Betlach M., Boyer H. W. (1977) in: Molecular Cloning of Recombinant DNA (Scott W. A., Werner A., eds), pp. 73—83.
10. Tanaka T., Weisblum B. (1975) J. Bacteriol., 121, 354—362.
11. Moore S. K., James E. (1976) Analyt. Biochem., 75, 545—554.
12. Clewley D. B., Helinski D. R. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 1159—1166.
13. Guerry P., Le Blanc D. J., Falkow S. (1973) J. Bacteriol., 116, 1064—1066.
14. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2110—2114.
15. Bolivar F., Rodriguez R. L., Betlach M. C., Boyer H. B. (1977) Gene, 2, 75—93.
16. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Lillehaug J. R., Klepper K. (1973) Biochemistry, 12, 5045—5050.
17. Davis R. W., Simon M., Davidson N. (1971) in: Methods of Enzymology (Grossman L., Moldave K., eds), v. XXI, pp. 413—428.

Поступила в редакцию  
5.IV.1979

\* При хранении клеток *E. coli* MM294 в виде суспензии в 30 мМ CaCl<sub>2</sub> при 4° наблюдалось значительное снижение уровня компетентности (за 1 сут — на 70%, за 3—10 сут — на 95%), но даже клетки с возрастом более 10—14 сут оставались пригодными для многих экспериментов.

# CONSTRUCTION OF THE HYBRID PLASMIDS CONTAINING TWO *ColE1* REPLICONS

BERLIN Yu. A., LEBEDENKO E. N., SHPAKOVSKII G. V.,  
KOROTKOV K. O.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Hybrid plasmids pBR322/*Eco* RI - CKΔ11/*Eco* RI (*Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>*) (pLCG1) and pBR322/*Hind* III-CKΔ11/*Hind* III (*Ap<sup>r</sup>Tc<sup>s</sup>Km<sup>r</sup>*) (pLCG2) have been constructed by *in vitro* recombination of the corresponding derivatives of the colicinogenic factor *ColE1*. Orientation of the pBR322 and CKΔ11 fragments in the pLCG1 molecule is determined by restriction analysis. The results obtained show that *Eco* RI does not affect the regions specifying antibiotic resistance in both original plasmids, whereas *Hind* III - insertions inactivate the *Tc<sup>r</sup>* determinant in pBR322. The pLCG1 plasmid can be used as a cloning vehicle (at the *Bam* HI site), the selection of recombinants being based on *Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>* → *Ap<sup>r</sup>Tc<sup>s</sup>Km<sup>r</sup>* phenotypic change.

---