

УДК 576.8.095.51

БИОХИМИЯ

О. И. ХЛЕБАЛИНА, Н. А. КАЛИНИНА, А. И. СТЕПАНОВ,
М. Ю. БЕБУРОВ, Г. Г. КРИВЦОВ, В. Г. ДЕБАБОВ

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНОЙ ПЛАЗМИДЫ Col E1-R6K

(Представлено академиком А. А. Базевым 15 VIII 1975)

За последние годы разработан простой метод ковалентного связывания фрагментов негомологичных ДНК *in vitro* (¹, ²). Метод основан на обработке ДНК специфическими эндонуклеазами рестриктазами, продуцирующими «липкие концы», и последующем объединении фрагментов путем отжига и сшивки дезоксиполинуклеотидлигазой. Если один из фрагментов ДНК содержит информацию, необходимую для автономной репликации («векторная молекула»), то второй фрагмент, ковалентно объединенный с первым, даже при отсутствии такой информации, может быть клонирован в бактериальных клетках в составе гибридной плазмиды. Внедрение гибридной плазмиды, полученной *in vitro*, может быть осуществлено у бактерий *Escherichia coli* методом трансформации клеток, обработанных CaCl_2 (³). В настоящее время в литературе описано функционирование у *E. coli* гибридных плазмид, несущих гены других плазмид (⁴), бактерий (⁴) и животных (⁵).

В данной работе мы описываем получение гибридной плазмиды, состоящей из ДНК колициногенного фактора Col E1 и ДНК плазмиды R6K. Плазмида Col E1 представляет собой кольцевую ДНК с молекулярным весом $4,2 \cdot 10^6$ дальтон, определяет продукцию клетками колицина E1 и имеет ослабленный контроль репликации, т. е. содержится в норме в количестве нескольких десятков копий на клетку. Интересной особенностью этой плазмиды является амплификация ее в условиях инкубации клеток с хлорамфениколом (⁶). Клетки *E. coli* 637, thy^- (Col E1) выращивали на среде M9 с добавкой 0,5% пептона и 10 мкг/мл тимина до титра $5 \cdot 10^8$ клеток/мл; амплифицировали ДНК Col E1 (до 1500 копий на клетку) путем инкубации с 170 мкг/мл хлорамфеникола в течение 15 час. Кольцевую сверхспиральную ДНК Col E1 выделяли по методу Клевела (⁶) центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия в присутствии этидиумбромиды. Выход сверхспиральной ДНК Col E1 составлял в наших опытах до 300 мкг на 1 г биомассы.

Плазмида R6K представляет собой кольцевую ДНК с молекулярным весом $28 \cdot 10^6$ дальтон, определяет устойчивость клетки к пенициллину и стрептомицину и относится к X группе совместимости (⁷). В отличие от Col E1 — это трансмиссибельная плазмида. Для R6K также характерен ослабленный контроль репликации (до 30 копий на клетку). Кольцевую ДНК R6K выделяли из клеток *E. coli*, выращенных до стационарной фазы роста в присутствии 15 мкг/мл стрептомицина, по тому же методу, что и ДНК Col E1. Выход сверхспиральной формы — до 45 мкг на 1 г биомассы. Рестриктазу EcoR1 выделяли из клеток *E. coli* NM182 (штамм К. М. Murray, University of Edinburgh; предоставлен В. И. Таяншиным) по методу Томаса и др. (⁸). Из 37 г биомассы получено 10 мл раствора фермента, 1 мкл которого способен за 30 мин. при 37° полностью рестрицировать 2 мкг ДНК Col E1. Активность рестриктазы определяли после электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле по методу Танаки (²). Дезоксиполинуклеотидлигазу выделяли из клеток *E. coli* B, инфицированных фагом T4 (amber

№ 81) по методу Вейса и др. ⁽⁹⁾. В работе использовали препарат с активностью 90 ед/мл (по Ричардсону ⁽⁹⁾).

В стандартном опыте «гибридизации» смесь 4 мкг ДНК Col E1 и 4 мкг ДНК R6K инкубировали 1 час при 37° в 0,2 мл раствора, содержащего 40 мМ трис-HCl (pH 7,4), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 10 мМ меркаптоэтанол, 5 мкл рестриктазы EcoR1. Реакция останавливалась нагреванием реакционной смеси до 65° в течение 5 мин. Половину реакционной смеси использовали для электрофоретического контроля полноты рестрикции (рис. 1а). Как следует из рисунка (рис. 1а, б) и в согласии с литературными данными, ДНК Col E1 дает один рестрикт ⁽⁴⁾, а ДНК R6K — два рестрикта с мол. весами $11 \cdot 10^6$ и $17 \cdot 10^6$ дальтон ⁽¹⁰⁾. Вторая половина (100 мкл) реакционной смеси охлаждалась до 0° и к ней прибавлялось 10 мкл 50 мМ MgCl₂, 10 мкл 0,1 М дитиозеритрита, 10 мкл 0,5 мМ аденозинтрифосфата, 20 мкл воды, 8 мкл лигазы (90 ед/мл). Смесь инкубировали при 0±0,5° в течение 53 час. и использовали затем для трансформации клеток *E. coli* C600 по методу Танаки и др. ⁽²⁾.

Исходя из возможности различных комбинаций при гибридизации расщепленных молекул ДНК Col E1 и R6K следовало ожидать образования нескольких классов гибридных молекул, которые во всех случаях должны детерминировать иммунность реципиентных клеток к колицину E1 и нести дефект в гене, контролирующем синтез колицина E1, так как рестриктаза EcoR1 расщепляет ДНК Col E1 в районе данного гена. Кроме того, определенные классы трансформантов с гибридной молекулой ДНК должны быть устойчивы к одному или двум антибиотикам, отражающим спектр лекарственной устойчивости плазмиды R6K.

Учитывая эти требования, отбор трансформантов был проведен на нескольких типах селективных сред, содержащих колицин E1, колицин и пенициллин, колицин и стрептомицин, а также пенициллин, стрептомицин или одновременно оба этих антибиотика. Колицин E1 был выделен модифицированным методом Фаулдса и Баррета ⁽¹¹⁾ и добавлен в 0,7%-ный агаризованный верхний слой среды Хоттингера в отношении 1:300. Пенициллин и стрептомицин добавляли в среду Хоттингера в концентрации 500 и 50 мкг/мл соответственно. После трансформации клетки реципиентного штамма инкубировали 3 часа при 37° на качалке в бульоне Хоттингера, после чего суспензию клеток рассеивали на селективные среды. Выросшие на селективных средах трансформанты были изучены на присутствие неселективных маркеров. Все колонии, выросшие на среде, содержащей колицин и пенициллин, оказались устойчивыми к стрептомицину и дефектными по синтезу колицина. Такому фенотипу могут отвечать по крайней мере два генотипа: 1) гибридная плазмида, состоящая из ДНК Col E1 и R6K, 2) гибридная плазмида, состоящая из ДНК Col E1 и одного из фрагментов ДНК R6K, детерминирующего устойчивость к пенициллину и стрептомицину.

У пяти отобранных трансформантов, устойчивых к стрептомицину, пенициллину и колицину, была изучена способность переносить устойчивость к колицину и антибиотикам в клетки реципиентного штамма *E. coli* J53-1 (устойчивого к налидиксовой кислоте) посредством конъюгации. В отличие от R6K, все 5 трансформантов утратили свойство трансмиссильности лекарственной устойчивости. Однако два вышеприведенных генотипа трудно различить генетическими методами. Поэтому мы проверили нали-

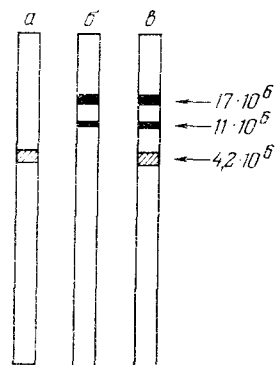


Рис. 1. Электрофорез в 3,7%-м агарозном геле фрагментов ДНК, полученных при рестрикции эндонуклеазой EcoR1. а — фрагменты ДНК Col E1, б — фрагменты ДНК R6K, в — фрагменты ДНК гибридной плазмиды Col E1-R6K

чие и характер гибридной плазмиды в одном из трансформантов с помощью прямого метода. Клетки этого трансформанта были размножены в жидкой среде, и сверхспиральная форма ДНК выделена так же, как и ДНК Col E1 (см. выше). Препаратами этой ДНК трансформировали клетки реципиентного штамма *E. coli* C600. В результате такой трансформации возникали клоны с нетрансмиссибельной устойчивостью к колицину, пенициллину и стрептомицину и неспособные синтезировать колицин. Трансформация клеток *E. coli* фрагментами гибридной плазмиды, полученными в результате исчерпывающей рестрикции эндонуклеазой *EcoR*I, дает только клоны, устойчивые к колицину и синтезирующие колицин, но не дает клонов, устойчивых к пенициллину и стрептомицину. Последнее обстоятельство указывает на то, что либо рестрикция затрагивает гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам, либо на то, что фрагмент R6K, несущий устойчивость к пенициллину и стрептомицину, не способен к самостоятельной репликации в клетках *E. coli*. На рис. 1в приведена картина электрофореза гибридной плазмиды после рестрикции эндонуклеазой *EcoR*I. Как видно из рисунка, гибридная плазида содержит оба рестрикта ДНК R6K и рестрикт ДНК Col E1.

Таким образом, гибридная плазида, полученная в данной работе, содержит обе исходные молекулы ДНК. В настоящее время ведется работа по выделению других классов гибридных плазмид.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов
Москва

Поступило
8 VIII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. N. Cohen, A. C. J. Chang *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 70, 3240 (1973).
- ² T. Tanaka, B. Weisblum, J. Bacteriol., v. 121, № 1, 354 (1975).
- ³ M. Mandel, A. Higa, J. Mol. Biol., v. 53, 159 (1970).
- ⁴ V. Herskfeld, H. W. Boyer *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 71, 3455 (1974).
- ⁵ J. F. Marrow, S. N. Cohen *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 71, 1743 (1974).
- ⁶ D. B. Clewell, J. Bacteriol., v. 110, 667 (1972).
- ⁷ P. Kontomichalou, M. Mitani, R. C. Clowes, J. Bacteriol., v. 104, 34 (1970).
- ⁸ M. Thomas, R. W. Davis, J. Mol. Biol., v. 91, 315 (1975).
- ⁹ B. Weiss, A. Jacquemin-Sablon *et al.*, J. Biol. Chem., v. 243, 4543 (1968).
- ¹⁰ R. Thompson, Mol. Gen. Genet., v. 133, № 2 (1974).
- ¹¹ J. Foulds, C. Barrett, J. Bacteriol., v. 116, 885 (1973).