

2. Карпова И. С., Пидпала О. В. Проявление нестабильности у лейцинзависимого ауксотрофа *Bacillus subtilis*, полученного с помощью ДНК сельди // Цитология и генетика.— 1986.— 20, № 1.— С. 40—46.
3. Пидпала О. В., Карпова И. С. Транспозиция нестабильной мутации сенной палочки, полученной с помощью чужеродной ДНК // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1989.— № 9.— С. 78—80.
4. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.— М.: Наука, 1984.— 472 с.
5. *Mobile genetic elements* / Ed. J. A. Shapiro.— New York: Acad. press, 1983.— 688 p.
6. Kleckner N. Transposable elements in prokaryotes // Ann. Rev. Genet.— 1981.— 15.— P. 341—404.
7. Murray G. E., Smith-Keary P. A recombination dependent replicating instability in *Salmonella typhimurium* // Mutat. Res.— 1976.— 36, N 2.— P. 283—290.
8. Trowsdale J., Anagnostopoulos C. Difference in the genetic structure of *Bacillus subtilis* strains carrying the *trpE*₂₆ mutation and strain 168 // J. Bacteriol.— 1976.— 126, N 2.— P. 609—618.
9. Site-specific recombination in transposition and plasmid stability / D. Sherratt, P. Dyson, M. Boocock et al. // Recombination at the DNA level // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Buol.— 1984.— 49.— P. 227—235.
10. Replicative and conservative transpositional recombination of the insertion sequences / T. A. Weinert, K. Derbyshire, F. M. Hughson et al. // Ibid.— P. 251—261.
11. Molecular mechanisms of general genetic recombination: The DNA-binding sites of the *RecA* protein / P. Howard-Flanders, S. C. West, J. R. Rusche et al. // Ibid.— P. 571—581.
12. Smith G. R. Homologous recombination in *E. coli*: multiple pathways for multiple reasons // Cell.— 1989.— 58, N 5.— P. 807—809.
13. Карпова И. С. Характер наследования состояния нестабильности у лейцинзависимого ауксотрофа *Bacillus subtilis*, индуцированного с помощью ДНК сельди // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1985.— № 3.— С. 69—72.
14. Барабанщиков Б. И. Механизмы репарации, рекомбинации и мутагенеза бактерий.— Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1984.— 117 с.
15. Карпова И. С. Получение мутаций у *Bacillus subtilis* с помощью чужеродной ДНК // Молекуляр. биология.— 1979.— Вып. 23.— С. 61—72.
16. Карпова И. С. Нестабильные мутанты *Bacillus subtilis*, индуцированные с помощью ДНК сельди // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1983.— № 6.— С. 66—70.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 21.09.90

УДК 577.152.34:579.852.11

Т. В. Сорочинская, С. И. Черных, В. А. Кордюм

ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ ФАГОЗАВИСИМОГО СИНТЕЗА β-ЛАКТАМАЗЫ TEM1 В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

На примере гена β-лактамазы разработана система амплификации гена. Использованная система позволяет получить до $6,0 \cdot 10^5$ единиц активности β-лактамазы в 1 мл культуральной жидкости и имеет то преимущество, что весь фермент находится в легкодоступной форме.

Введение. Развитие методов генной инженерии позволило практически любой ценный ген вводить в чужеродный организм. Для достижения высокоэффективной продукции клонированного гена используют несколько путей. Один из них — это увеличение числа копий гена в клетке, или амплификация гена. Для амплификации гена и соответственно получения увеличенного количества продукта, за синтез которого отвечает этот ген, используют, как правило, умеренные плазмиды или фаги.

Возможность амплификации генов на плаزمиде основана на том, что ряд плазмид имеет релаксированный контроль репликации, т. е. количество их в клетке может составлять от нескольких копий до нескольких тысяч [1]. Наибольшее распространение получили плазмиды

© Т. В. СОРОЧИНСКАЯ, С. И. ЧЕРНЫХ, В. А. КОРДЮМ, 1991

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1991. Т. 7. № 2.

2*

19

серии *pBR*, имеющие *ColE*-подобный репликон. Однако вероятность использования плазмид для амплификации клонированных генов осложняется несколькими обстоятельствами. Прежде всего, это нестабильность гибридных плазмид. Гибридные плазмиды могут расщепляться, образуя миниплазмиды, или вообще элиминировать из клетки-производителя при ферментации. Для поддержания стабильности плазмид необходимо создавать селективные условия. При сверхпродукции чужеродных белков в клетках *E. coli* очень часто происходит также агрегация этих белков, формирование нерастворимых гранул, кристаллообразование, что в дальнейшем очень усложняет технологию выделения и очистки фермента из биомассы [2, 3]. Все это создает трудности при использовании плазмидосодержащих штаммов бактерий для биосинтеза тех продуктов, ген которых клонирован в плазмиду.

Некоторые из этих трудностей можно преодолеть, используя для амплификации генов умеренные фаги. На их основе в настоящее время создан ряд векторов, которые могут служить не только целям клонирования генов, но и их амплификации. В фаги можно встраивать фрагменты ДНК и помещать их под контроль определенных промоторов для экспрессии встроенных генов. При таких условиях гены, включенные в состав ДНК фага, могут экспрессироваться как с собственного промотора, так и с промоторов фагового генома. Чтобы транскрипция была эффективной, промотор должен быть сильным. Таковыми являются промоторы левосторонней транскрипции фага $\lambda(P_L)$, промотор *trp*-оперона, *lac*-оперона и др. С целью продления времени функционирования генов, встроенных в фаг λ , и предотвращения лизиса клеток используют мутации в ряде регуляторных генов фага. Было показано [4], что при использовании *Q*- и *QS*-мутаций фага λ в бактериальной клетке накапливалось до 50 % белков *trp*-оперона от суммарных растворимых белков клетки. Такой же результат был получен и при использовании мутантов *N*-гена фага λ . Однако работа с фагозависимыми системами суперсинтеза также затруднена рядом обстоятельств. Одно из них — частый лизис бактериальных клеток до полного накопления продукта клонированного гена.

В данном исследовании мы использовали преимущества обоих способов амплификации генов — на плаزمиде и на фаге λ , объединив их в одной системе.

Материалы и методы. Для выращивания культур применяли стандартную питательную среду «Аминопептид».

Бактериальные штаммы и бактериофаги, использованные в исследованиях: *E. coli* *W3101recA-13Su⁰* — штамм-производитель β -лактамазы; *E. coli* K12802, содержащий плазмиду *pCV11*, предоставлен Т. Н. Копыловой-Свиридовой (ИБФМ АН СССР, Пушкино); *E. coli* *RLM1 λ blaQam117Ram54* — источник фага; *E. coli* *RLMISu⁺* — индикаторный штамм для определения титра фага.

Плазмиды *pMCR4* и *pMCR11b* получены из лаборатории В. Г. Коробко (ИБХ АН СССР, Москва).

Рестриктаза *EcoRI* производства НПО «Фермент» (Вильнюс).

Выделение плазмидой ДНК и определение копийности осуществляли по методу, описанному в литературе [5].

Трансформацию плазмид в штамм *E. coli* *W3101* проводили по методу [6].

Получение фаголизата описано ранее [7].

Активность β -лактамазы определяли йодометрически [8]. За единицу активности принимали наименьшее количество β -лактамазы, способной инактивировать 10^{-7} М пенициллина (60 ед.) за 1 ч при 37 °С в фосфатном буфере, pH 6,8—7,0.

Результаты и обсуждение. При исследовании синтеза β -лактамазы TEM1 в различных штаммах *E. coli* по фагозависимой технологии установлено, что максимальный выход фермента возможен при инфицировании бессупрессорного штамма *E. coli* *W3101* фагом λ *c1857bla*, несущим амбер-мутации в поздних генах *Q* и *R* [7]. Ген *bla* клонирован

в фаге таким образом, что его экспрессия контролируется сильными промоторами *lac* и *P_L*.

С целью оптимизации системы синтеза β-лактамазы в клетках *E. coli* использован ряд плазмид, содержащих *bla*-ген, — *pCV11*, *pBR322*, *pMCR4*, *pMCR11b*, *pGEM1*. Для этого упомянутые плазмиды были трансформированы в *E. coli*, затем плазмидосодержащие штаммы выращивали в условиях интенсивной аэрации до логарифмической фазы роста и заражали фагом. Через 14—16 ч после заражения определяли активность β-лактамазы. Уровень синтеза фермента в штамме-продуценте, содержащем различные плазмиды, отражен в таблице.

*Активность β-лактамазы в штамме-продуценте E. coli W3101, содержащем плазмиды различной копийности, при заражении фагом λc1857blaQ-R-
β-lactamase activity in the E. coli W3101 produced strain which contain plasmids with different copy number after infection of the λc1857blaQ-R- page*

Плаزمида	Копийность плазмид в клетке	Активность β-лактамазы, ед/мл лизата	Плазмида	Копийность плазмид в клетке	Активность β-лактамазы, ед/мл лизата
<i>pCV11</i>	15±5	3,5·10 ⁴	<i>pMCR11b</i>	30±10	7,7·10 ⁴
<i>pBR322</i>	40±10	3,2·10 ⁵	<i>pGEM1</i>	80±10	6,0·10 ⁵
<i>pMCR4</i>	30±10	1,5·10 ⁵			

Согласно литературным данным [9], плазмиды *pMCR4* и *pMCR11b*, производные плазмиды *pBR322*, являются многокопийными. Можно было ожидать, что большее число копий плазмиды будет способствовать повышению выхода β-лактамазы. Однако в нашей системе мы этого не наблюдали.

Наибольший выход β-лактамазы при заражении фагом имел место в штамме с плазмидой *pGEM1* и составлял 6,0·10⁵. Определение копийности всех изученных плазмид показало, что плазмиды *pMCR4*, *pMCR11b* и *pBR322* в штамме *E. coli W3101* содержатся в примерно одинаковом количестве — 30—40 копий на клетку бактерии. Копийность *pCV11* — 15, а *pGEM1* — около 80.

Таким образом, на примере β-лактамазы нами впервые была разработана двойная система синтеза продукта гена, клонированного как в фаге, так и в плазмиде. Основным преимуществом такой системы является то обстоятельство, что в конце ферментации при соблюдении соответствующих условий весь фермент находится в культуральной жидкости, а не заключен в клетку, как это было бы при использовании только плазмидной технологии. Объединение плазмидной и фаговой технологий обеспечивает получение большого количества β-лактамазы в легкодоступной форме, что весьма важно для дальнейшего выделения и очистки этого препарата.

Резюме

На прикладі гену β-лактамази розроблена система ампліфікації гену. Використана система дозволяє одержувати до 6,0·10⁵ одиниць активності β-лактамази в 1 мл культуральної рідини і має ту перевагу, що увесь фермент знаходиться в легкодоступній формі.

Summary

The original system of the β-lactamase gene amplification has been worked out. Such a system can produce 6.0·10⁵ units of β-lactamase activity per ml of cultural medium and has such an advantage as the accessible enzyme form.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Plasmid Col E₁* as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA / V. Hersfield, H. W. Boyer, C. Yanovsky, M. A. Lovett // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1974.— 71, N 9.— P. 3455—3459.
2. *Overexpression, solubilization and refolding of a genetically engineering derivative of the penicillinbinding protein 3 of E. coli K 12* / G. B. de Belder, M. N. Disteché, H. N. Houba et al. // *Mol. Microbiol.*— 1988.— 2, N 4.— P. 519—525.
3. *Localization of inclusion bodies in E. coli overproducing β -lactamase or alkaline phosphatase* / G. Georgion, J. N. Telford, M. L. Shuler, D. B. Wilson // *Appl. Envir. Microbiol.*— 1986.— 52, N 5.— P. 1157—1161.
4. Moir A., Brammer W. J. The use of specialised transducing phages in the amplification of enzyme production // *Mol. and Gen. Genet.*— 1976.— 149, N 1.— P. 87—99.
5. *Плазмиды. Методы* / Под ред. К. Харди.— М.: Мир, 1989.— 267 с.
6. Dageri M., Ehrlich S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells // *Gene.*— 1979.— 6, N 1.— P. 23—28.
7. Сорошинская Т. В., Черных С. И. Исследование синтеза β -лактамазы TEM 1 в различных штаммах *E. coli* при заражении их фагом λ b1a с амбер-мутациями в регуляторных генах // *Биополимеры и клетка.*— 1991.— 7, № 1.— С. 101—107.
8. Чайковская С. М., Венкина Т. Г. Модифицированный иодометрический метод определения активности β -лактамазы // *Антибиотики.*— 1962.— 7, № 5.— С. 453—456.
9. Гуревич А. И., Бабий Н. И. Роль структурных элементов плазмид группы *Col E₁* в контроле репликации // *Биоорг. химия.*— 1987.— 13, № 2.— С. 213—218.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 27.07.90

УДК 579.254

О. Н. Добачевская, С. Е. Рымарь, В. А. Кордюм

ВЛИЯНИЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА ПЕРЕНОС ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В Ti-ПЛАЗМИДУ AGROBACTERIUM TUMEFACIENS, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЙ С ПОМОЩЬЮ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ВЕКТОРОВ

*Изучали влияние УФ-облучения реципиентных клеток *A. tumefaciens* на частоту переноса чужеродных генов в Ti-плазмиду, осуществляемого с помощью промежуточных векторов. Показано, что эффективность переноса возрастает в 10—100 раз после кратковременного облучения реципиентных клеток. УФ-облучение клеток *A. tumefaciens* перед конъюгацией предлагается в качестве приема для повышения эффективности переноса чужеродных генов в Ti-плазмиду *A. tumefaciens* при использовании для этого промежуточных векторов.*

Введение. Один из наиболее распространенных способов переноса чужеродных генов в растительный геном заключается в трансформации растительных клеток Ti-плазмидой *A. tumefaciens*. Чужеродные гены либо вводятся в Ti-плазмиду с помощью промежуточных векторов [1] и в составе T-ДНК сопереносятся в растительный геном, либо такой соперенос осуществляется бинарной системой [2]. При использовании промежуточных векторов перенос чужеродного гена в Ti-плазмиду происходит за счет рекомбинации *in vivo* между гомологичными участками промежуточного вектора и Ti-плазмиды. Частота появления трансконъюгантов, содержащих коинтеграцию Ti-плазмиды — промежуточный вектор, отражает эффективность двух процессов: переноса плазмиды в реципиентную клетку и рекомбинации и также зависит от протяженности области гомологии [3]. Эта величина, как правило, невелика (10^{-8} — 10^{-7} на реципиентную клетку) и в некоторых случаях получить трансконъюганты без определенных усилий не удается.

В данной работе описано применение УФ-облучения реципиентных клеток агробактерий для повышения частоты переноса чужеродных генов в Ti-плазмиду, происходящего в результате рекомбинации между Ti-плазмидой и плазмидой, в которой локализован чужеродный ген, т. е. промежуточным вектором.

© О. Н. ДОБАЧЕВСКАЯ, С. Е. РЫМАРЬ, В. А. КОРДЮМ, 1991