

8. *Nguyen Van Hoa*. Blue-green algae from the south of Viet Nam and their usage in agriculture // Abstr. PhD thesis.—Kiev, 1990.—P. 21.
9. *Reddy P. M., Roger P. A.* Dynamics of algal population and acetyl-enereducing activity in five rice soils inoculated with blue-green algae // *Biol. Fertil. Soils.*—1988.—6, N 1.—P. 14—21.
10. *Grant I. F., Roger P. A., Watanabe I.* Effect of grazer regulation and algal inoculation on photodependent nitrogen fixation in a wetland rice field // *Ibid.*—1985.—1, N 1.—P. 61—72.
11. *Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from Escherichia coli to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria* / C. P. Wolk, A. Vonshak, P. Kehoe, J. Elhai // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 6.—P. 1561—1665.
12. *Arber W., Linn S.* DNA modification and restriction // *Ann. Rev. Biochem.*—1969.—38.—P. 467—500.

Inst. Exp. Biol., Viet Nam
 Inst. Mol. Biol. and Genet., Ukr.
 Acad. Sci., Kiev
 Michigan State Univ., USA

16.04.92

УДК 579.252.5

М. Ф. Алексеев, Г. Л. Ковтунович, А. Н. Кравец, А. С. Солонин

ВЕКТОРЫ КЛОНИРОВАНИЯ ДЛЯ *ESCHERICHIA COLI* И ЭНДОРИЗОСФЕРНОГО АЗОТФИКСАТОРА *KLEBSIELLA* *oxytoca* VN13 НА ОСНОВЕ РЕПЛИКОНА ПРИРОДНОЙ *hsd* ПЛАЗМИДЫ *pZES*

На основе репликона природной *hsd* плазмиды *Citrobacter freundii* сконструированы векторные плазмиды для *K. oxytoca* VN13 и *E. coli*. Векторы *pKAS18* и *pKAS19B* имеют селективный маркер устойчивости к канамицину и полилинкеры плазмид *pUC18* и *pUC19* соответственно. Плазмиды *pMG1k* и *pMG21k* предназначены для клонирования в уникальном *PstI* сайте гена рестриктазы *EcoRV*.

Введение. В связи с обострившейся экологической ситуацией все большую актуальность приобретают исследования в области генетики азотфиксирующих микроорганизмов. Понимание молекулярных механизмов азотфиксации и взаимодействия бактерий с растениями позволит решить проблему связанного азота путем создания экологически чистых бактериальных удобрений. Использование для этих целей генетически измененных свободноживущих и эндоризосферных азотфиксирующих микроорганизмов представляется нам весьма перспективным.

Ранее были выделены азотфиксирующие энтеробактерии *K. oxytoca* VN13, обладающие двумя уникальными свойствами:

1) будучи способными колонизировать сосудистые пучки растений, они занимают уникальную экологическую нишу, что делает их исключительно конкурентоспособными по отношению к почвенной микрофлоре [1];

2) эти бактерии выделяют естественный стимулятор роста растений — индолил-3-уксусную кислоту [2].

Полевые испытания показали, что сочетание этих двух свойств повышает урожай на 100 % при обработке семян перед посевом суспензией бактерий. Генетическое изменение полезных свойств *K. oxytoca* VN13 в сторону их усиления предполагает создание эффективной системы клонирования генов в этом организме, и, в первую очередь, конструирование высокостабильных векторов, обладающих удобными селективными маркерами, чему и посвящена данная работа.

Материалы и методы. В работе использованы: штаммы *E. coli* JM109 *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *thi*, *supE44*, *relA1*, λ -, Δ (*lac-proA*, *B*), *F'*, *traD36*, *proA*, *B*, *lacIqZAM15* [3]; *E. coli* Z85 Δ (*lac-proA*, *B*),

© М. Ф. Алексеев, Г. Л. Ковтунович, А. Н. Кравец, А. С. Солонин, 1992

Δ (*srl-recA*), *hsdR*, *F'*, *lacIqZAM15*, *proA*, *B*, *traD* [4], штаммы *Erwinia carotovora subsp. carotovora* ИМВ88351, *Enterobacter cloacae* ССМ1902, *E. aerogenes* ССМ2531 — дикий тип, представлены О. Е. Жеребило (ИМВ АНУ); плазмиды *pUC18*, *pUC19* [5], *pUC4k* [6], *pHSG415* [7], *pHP45ΩTc*, *pHP45ΩCm* [8], *pEF42*, *pBGM5*, *pRMK2*, ферменты НПО «Ферментас», рестриктаза *BmeI42I* [9], любезно предоставленная Н. Н. Матвиенко.

Выделение плазмидной ДНК, элюцию фрагментов ДНК из агарозных гелей, гидролиз ДНК ферментами рестрикции, лигирование, приготовление и трансформацию компетентных клеток *E. coli* осуществляли, как описано ранее [10]. Трансформацию *K. oxytoca* VN13, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. carotovora* проводили разработанным нами методом [11].

Стабильность поддержания плазмид в клетках *E. coli* и *K. oxytoca* VN13 оценивали путем пассажей в неселективных условиях в жидкой среде (аминопептид) с последующим высевом на ту же неселективную агаризованную среду. Выросшие колонии перекалывали параллельно на неселективные и селективные чашки.

Копийность плазмид *pKAS18* и *pKAS19* определяли по внутреннему стандарту. Штамм *E. coli* JM109 трансформировали плазмидами *pKAS18* и *pBR322*. Котрансформанты отбирали на чашках, содержащих ампициллин (Ар) и канамицин (Км). Из котрансформантов выделяли суммарную плазмидную ДНК, гидролизовали ее рестриктазой *EcoRI* и разделяли фрагменты электрофорезом в 0,8 %-м агарозном геле. После окраски гель фотографировали в ультрафиолетовом свете и негатив сканировали на лазерном денситометре. Площади пиков на денситограмме считали пропорциональными количеству ДНК, а копииность *pBR322* принимали равной 19—26 копиям на геном *E. coli* [12].

Активность рестриктазы *EcoRV* в клонах *E. coli* определяли следующим образом. В пластиковых центрифужных пробирках (1,5 мл) осаждали центрифугированием клетки из 1 мл ночной культуры (2 мин, 10 000 g) и суспендировали осадок в 500 мкл буфера А: 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 7 мМ 2-меркаптоэтанол. Суспензию озвучивали на дезинтеграторе MSE в течение 1 мин (4 раза по 15 с с 15-с паузами) в ледяной бане при амплитуде 12 мкм. После удаления клеточного дебриса (10 000 g, 2 мин) 3 мкл супернатанта инкубировали с 1 мкг ДНК фага λ в 15 мкл буфера со средней ионной силой [10] (37 °С, 15 мин). Инкубационную смесь подвергали электрофорезу в 0,8 %-м геле агарозы, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

Активность метилазы *EcoRV* в клонах *E. coli* определяли по защите от рестрикции фага λ vir. Фаг λ vir выращивали на исследуемом штамме *E. coli*, как описано ранее [13]. Осветленный лизат серийно разводили. В две чашки с агаризованной средой LB втирали по 100 мкл ночной культуры *E. coli* Z85 и *E. coli* Z85 (*pEF42*) и по 2 мкл каждого разведения высевали параллельно на обе чашки. Чашки инкубировали в течение ночи при 37 °С. Система рестрикции — модификации *EcoRV*, гены которой несет *pEF42*, сильно (в 10⁷ раз) ограничивает рост фага λ vir [14]. Поэтому по разнице в титре фага на газонах *E. coli* Z85 и *E. coli* Z85 (*pEF42*) легко отличить метилированный фаг от неметилированного.

Результаты и обсуждение. Основным недостатком векторов на основе репликона *pMB1* (векторы серий *pUC*, *pBR* и др.) является их нестабильность в неселективных условиях [15], что делает затруднительным или невозможным их использование для генноинженерного улучшения штаммов микроорганизмов с последующим выпуском этих штаммов в окружающую среду. Кроме того, большинство этих векторов несет ген устойчивости к ампициллину, в то время как *K. oxytoca* VN13 устойчива к этому антибиотику в концентрации до 1—2 мг/мл. В связи с этим при создании векторов для *K. oxytoca* VN13 нами был выбран репликон *pZE8* природной плазмиды *S. freundii*, кодирующей систему рестрикции — модификации *CfrBI*. Мы наблюдали высокую

стабильность этого репликона в *E. coli*. Делеционный вариант *pZE8* — плаزمид *pBGM5* размером 3,2 т. п. н. и плазмид *pRMK2*, содержащая в уникальном *MluI* сайте *pBG5* ген *Km^rTn903*, были сконструированы нами ранее.

Для проверки способности репликона *pZE8* функционировать в клетках *K. oxytoca* VN13 была произведена трансформация этого штамма ДНК плазмиды *pRMK2*. Из отобранных 100 *Km^r* трансформантов в 10 определяли наличие рестриктазы *CfrBI*. Во всех 10 клогах обнаружена специфическая ДНКазная активность, характерная для *CfrBI*. Плазмиды, выделенные из этих клонов, анализировали при помощи рестриктаз *EcoRI* и *EcoRV*. Различий в рестрикционной картине между *pRMK2* и этими плазмидами выявить не удалось.

Конструирование векторов *pKAS18* и *pKAS19*. Плазмиды *pUC18* и *pUC19* представляют собой чрезвычайно удобные для клонирования векторы. Основное их преимущество — наличие полилинкера, включающего 13 уникальных сайтов рестрикции внутри α -фрагмента гена β -галактозидазы, что значительно облегчает селекцию рекомбинантных клонов, которые могут быть отобраны на чашках с IPTG и X-gal как бесцветные колонии на фоне окрашенных нерекомбинантных [5].

Для конструирования векторов *pKAS18* и *pKAS19*, сочетающих наличие полилинкера *pUC18* и *pUC19* соответственно с селективным маркером *Km^r* и высокостабильным репликоном *pZE8* в плазмиде *pRMK2* была произведена делеция, затрагивающая гены рестриктазы и метилазы *CfrBI*, при помощи рестриктазы *EcoRV*. Полученную в результате плазмиду *pRMK2 Δ RV* вновь гидролизировали *EcoRV* и лигировали с *BmeI42I*-фрагментами плазмид *pUC18* и *pUC19*, один из которых размером около 450 п. о. содержит α -фрагмент гена *lacZ* с полилинкером *pUC18* или *pUC19*. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Z85. Клоны, содержащие *pKAS18* или *pKAS19*, отбирали на агаризованной среде LB с канамицином, IPTG и X-gal как окрашенные колонии (рис. 1).

При клонировании полилинкера *pUC19* были обнаружены два типа окрашенных колоний: большие (около 2/3 числа всех окрашенных колоний) и малые (1/3 числа всех окрашенных колоний). Рестрикционный анализ плазмидной ДНК, выделенной из малых и больших колоний (плазмиды *pKAS19M* и *pKAS19B* соответственно), показал, что транскрипция с *lac*-промотора направлена к *ori pZE8* в плазмиде *pKAS19M* и от него в плазмиде *pKAS19B*. При клонировании полилинкера *pUC18* все окрашенные колонии имели одинаковый размер и ориентацию клонированного фрагмента, идентичную таковой в плазмиде *pKAS19B*.

Копийность плазмид *pKAS18* и *pKAS19B*, определенная по внутреннему стандарту *pBR322*, составляет 4—10 копий на клетку *E. coli* JM109.

Полилинкеры *pKAS18* и *pKAS19* имеют уникальные сайты клонирования для 10 рестриктаз: *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *BamHI*, *PstI*, *SalI*, *SphI* и *HindIII*, *HincII* и *AclI*.

При помощи плазмид *pKAS18* и *pKAS19B* нами были успешно трансформированы штаммы *E. carotovora subsp. carotovora* UMB8351, *E. cloacae* ССМ1902 и *E. aerogenes* ССМ2531, что свидетельствует о возможности использования этих плазмид в качестве векторов клонирования для генноинженерных манипуляций с этими организмами.

Стабильность плазмид. Была исследована стабильность наследования плазмид *pRMK2*, *pKAS18*, *pKAS19B*, *pKAS19M* и *pUC4k* в *K. oxytoca* VN13. Плазмиды *pKAS19M* оказалась чрезвычайно нестабильной в неселективных условиях (ее сохраняли менее 1% клонов после 10 генераций). В тех же условиях потери плазмид *pKAS18*, *pKAS19B* и *pRMK2* не наблюдалось в течение, по крайней мере, 50 генераций. Плазмиду *pUC4k* после 50 генераций в неселективных условиях сохраняли лишь 23% клонов *K. oxytoca* VN13. Таким образом,

плазмиды *pKAS18* и *pKAS19B* обладают повышенной стабильностью в *K. oxytoca* VN13 по сравнению со своими аналогами — плазмидами серии *pUC*.

Конструирование плазмид *pMG1k* и *pMG21k*. Плазмиды *pMG1k* и *pMG21k* являются векторами замещения, сконструированными на основе гена рестриктазы *EcoRV*, и несут в уникальном *PstI*-сайте этого гена балластный фрагмент ДНК (ген *Km^rTn903* из плазмиды *pUC4k*), предотвращающий цитотоксический эффект рестриктазы на метилированную ДНК бактерии-хозяина.

Для конструирования плазмид *pMG1k* и *pMG21k* необходимо было пространственно разделить гены ре-

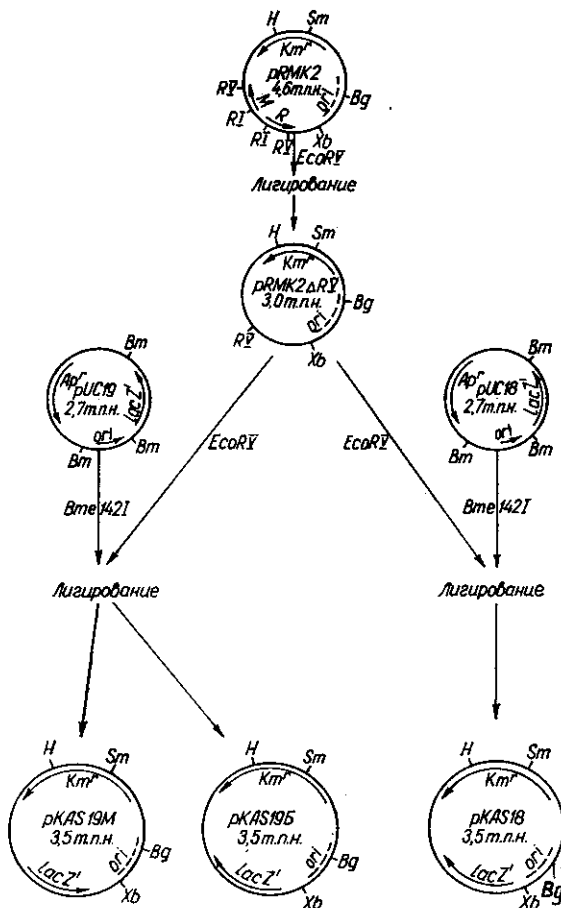


Рис. 1. Схема конструирования плазмид *pKAS18*, *pKAS19B* и *pKAS19M*. Сайты рестрикции: *Bg* — *BglII*; *Bm* — *BmeI42I*; *H* — *HindIII*; *RI* — *EcoRI*; *RV* — *EcoRV*; *Sm* — *SmaI*; *Xb* — *XbaI*. Стрелками указаны направления транскрипции генов; *ori* — область начала репликации

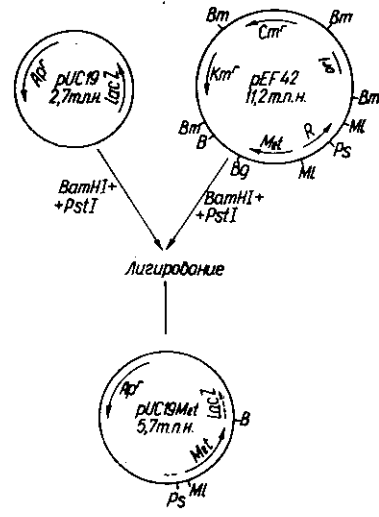


Рис. 2. Схема конструирования плазмиды *pUC19Met*. Сайты рестрикции: *Bg* — *BglII*; *B* — *BamHI*; *Bm* — *BmeI42I*; *Ml* — *MluI*; *Ps* — *PstI*. Стрелками указаны направления транскрипции генов

стриктазы и метилазы *EcoRV*, что и было достигнуто субклонированием *BamHI-PstI*-фрагмента плазмиды *pEF42* в плазмиде *pUC19* (рис. 2). Штамм *E. coli* Z85, содержащий полученную в результате плазмиду *pUC19Met*, был проанализирован для выявления синтеза активной метилазы *EcoRV*, как описано в «Материалах и методах». Фаг *λvir*, выращенный на штамме *E. coli* Z85 (*pUC19Met*), имел равный титр на газонах *E. coli* Z85 и *E. coli* Z85 (*pEF42*).

В дальнейшем в плазмиде *pBGM5* была произведена делеция, затрагивающая гены рестриктазы и метилазы *CfrBI*, и удаленный фрагмент был заменен геном *St^r* плазмиды *pHP45ΩSt*. Для этого обе плазмиды гидролизовали *EcoRI* и образовавшиеся фрагменты лигировали между собой. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM109 и отбирали клоны с фенотипом *St^r*, *Ap^s*. Полученную в результате плазмиду *pBGM5St* размером 6,3 т. п. н. гидро-

лизовали *MluI* и лигировали с *MluI*-фрагментами плазмиды *pEF42*. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Z85 (*pUC19Met*) и отбирали клоны с фенотипом Ap^R , Cm^R , Km^S (рис. 3). Среди 100 клонов с данным фенотипом были отобраны 10, синтезировавших активную рестриктазу *EcoRV*, как описано в «Материалах и методах». Из всех 10 клонов выделили плазмидную ДНК и трансформировали ею компетентные клетки *E. coli* JM109. Равные алиquotы

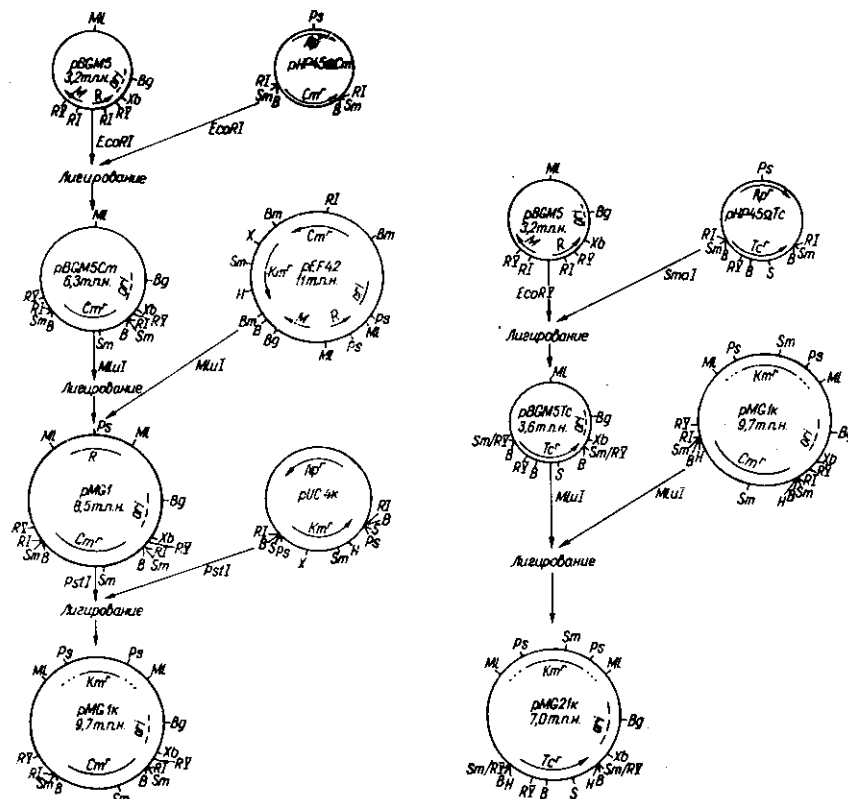


Рис. 3. Схема конструирования плазмиды *pMG1k*. Сайты рестрикции: *B* — *BamHI*; *Bg* — *BglII*; *Bm* — *BmeI42I*; *H* — *HindIII*; *Ml* — *MluI*; *Rl* — *EcoRI*; *Rv* — *EcoRV*; *Ps* — *PstI*; *Sm* — *SmaI*; *X* — *XhoI*; *Xb* — *XbaI*; *S* — *SaiGI*. Стрелками указаны направления транскрипции генов; *ori* — область начала репликации

Рис. 4. Схема конструирования плазмиды *pMG21k*. Сайты рестрикции: *B* — *BamHI*; *Bg* — *BglII*; *Bm* — *BmeI42I*; *H* — *HindIII*; *Ml* — *MluI*; *Rl* — *EcoRI*; *Rv* — *EcoRV*; *Ps* — *PstI*; *Sm* — *SmaI*; *X* — *XhoI*; *Xb* — *XbaI*; *S* — *SaiGI*. Стрелками указаны направления транскрипции генов; *ori* — область начала репликации

каждой трансформационной смеси (по 100 мкл) были высеяны параллельно на чашки с хлорамфениколом и ампициллином. Исходя из того, что желаемая конструкция, содержащая в уникальном *MluI*-сайте *pBGM5Cm* ген рестриктазы *EcoRV* размером 2,2 т. п. н., должна давать Cm^R -трансформанты только в результате котрансформации с *pUC19Met*, отобраны один клон (N40), плазмидная ДНК которого трансформировала *E. coli* JM109 по маркеру *Cm^r* в 50 раз хуже, чем по маркеру Ap^r . При этом все Cm^R -клоны были устойчивыми к ампициллину и имели активность рестриктазы *EcoRV*, т. е. содержали плазмиду *pUC19Met* и другую плазмиду, названную *pMG1*, содержащую в уникальном *MluI*-сайте *pBGM5Cm* ген рестриктазы *EcoRV*. Рестрикционный анализ плазмид клона N40 подтвердил это предположение.

Плазмиды *pMG1* может быть использована в качестве вектора прямой селекции при клонировании в уникальном *PstI*-сайте, находящемся в структурной части гена рестриктазы *EcoRV*. Для этого плазмиды

pUC19Met и *pMG1* необходимо разделить либо электрофорезом в агарозном геле после линейаризации обеих плазмид *PstI*, либо центрифугированием в градиенте плотности CsCl после линейаризации *pUC19Met* рестриктазой *KpnI* (*pMG1* не имеет сайтов *KpnI*). Нами было обнаружено, что разделение линейных форм *pUC19Met* и *pMG1* не всегда является удовлетворительным, особенно при повышенных нагрузках ДНК в геле вследствие недостаточной разницы в размере плазмид (8,5 и 5,7 т. п. н. соответственно). Второй способ разделения плазмид требует большого расхода *KpnI*. Для облегчения манипуляций с *pMG1* была сконструирована плаزمиды *pMG1k*, содержащая в *PstI*-сайте *pMG1* ген *Km^rTn903*. Суммарную ДНК плазмид клона N40 гидролизовали *PstI* и лигировали с элюированным из геля фрагментом (1,2 т. п. н.) плазмиды *pUC4k*. Отобранные клоны с фенотипом *Km^R*, *Sm^R*, *Ap^S* содержали плазмиду *pMG1k* (см. рис. 3).

Для конструирования плазмиды *pMG21k* плазмиду *pBGM5* гидролизовали рестриктазой *EcoRV* и лигировали с элюированным из геля *SmaI*-фрагментом (2,0 т. п. н.) плазмиды *pHP45Q^{Tc}*. Полученную в результате плазмиду *pBGM5Tc*, в которой в результате делеции инактивированы гены рестриктазы и метилазы *CfrBI*, гидролизовали *MluI* и лигировали с *MluI*-фрагментами плазмиды *pMG1k*. После трансформации лигазной смесью компетентных клеток *E. coli* JM109 отбирали клоны с фенотипом *Km^R*, *Tc^R*, *Sm^S*. Рестрикционный анализ плазмид полученных клонов показал, что они содержат *Tc^r* плазмиду (названную *pMG21k*), в которой ген рестриктазы *EcoRV* инактивирован вставкой гена *Km^r* (рис. 4).

Возможность использования плазмид *pMG1k* и *pMG21k* в качестве векторов замещения исследовали в следующем эксперименте: обе плазмиды гидролизовали *PstI* и элюировали из геля фрагменты, соответствующие векторной части. Затем эти фрагменты лигировали с *PstI*-фрагментом плазмиды *pUC4k*, несущим ген *Km^r*, и трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM109. Трансформанты отбирали на чашках с хлорамфениколом (*pMG1k*) или тетрациклином (*pMG21k*). Полученные клоны проверяли на устойчивость к канамицину. Устойчивость к данному антибиотику обнаружена у 96 % *Sm^R* и 98 % *Tc^R* клонов. Таким образом, эффективность клонирования в векторах *pMG1k* и *pMG21k* составляет 96 и 98 % соответственно.

Плазмиды *pMG1k* и *pMG21k* можно использовать для клонирования *PstI*-фрагментов ДНК, например, при создании геномных библиотек микроорганизмов или для клонирования кДНК при помощи присоединения гомополимерных dC·dG последовательностей [16]. Кроме того, плазмиды *pMG21k* имеет уникальные сайты рестрикции *SmaI/XmaI* в гене *Km^r* и *Sall*, *EcoRV* в гене *Tc^r*. Сайты *EcoRV* и *Sall* могут быть использованы для клонирования с использованием прямой селекции рекомбинантных молекул [17, 18].

Таким образом, сконструированы векторы клонирования для *E. coli* и *K. oxytoca* VN13, отличающиеся повышенной стабильностью и пригодные для генноинженерной модификации эндоризосферного азотфиксатора *K. oxytoca* VN13.

Summary. Natural *Citobacter freundii* *hsd* plasmid based vector plasmids for *Klebsiella oxytoca* VN13 and *Escherichia coli* have been constructed. *pKAS18* and *pKAS19B* vectors consist of *pZE8 ori*, *Tn903 Km^r* gene and polylinkers of *pUC18* or *pUC19* respectively. *pMG1k* and *pMG21k* plasmids allow cloning into the unique *PstI* site of the *EcoRV* restrictase gene.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азотфиксирующие бактерии колонизируют ксилему корня риса / Т. Н. Х. Нгуен, Т. Н. Б. Тон, В. А. Тарасенко и др. // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 2.—С. 97—99.
2. Козырьковская Н. А., Макитрук В. Л., Рукдашел Э. Азотфиксирующие виды *Kleb-*

- siella выделяют индолил-3-уксусную кислоту // Там же.—1990.—6, № 6.— С. 93—95.
3. *Kayzer K., Murrey H., Davis P. B.* Клонирование ДНК. Методы.— М.: Мир, 1988.— 538 с.
 4. *Клонирование и характеристика гена recA из Pseudomonas aeruginosa / Е. Н. Зайцев, Е. М. Зайцева, И. В. Бахланова и др.* // Генетика.—1986.—22, № 11.—С. 2721—2727.
 5. *Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J.* Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene.—1985.—33, N 1.—P. 103—110.
 6. *Vieira J., Messing J.* The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Ibid.—1982.—19, N 3.—P. 295—268.
 7. *Горовиц Р. Л., Солонин А. С.* Плазмидные векторы «инсерционной инактивации маркера устойчивости к триметоприму // Генетика.—1987.—23, № 3.— С. 397—404.
 8. *Fellay R., Frey J., Krisch H.* Integron mutagenesis of soil and water bacteria // Gene.—1987.—52, N 2.—P. 147—154.
 9. *Isolation and properties of a new site-specific endonuclease BmeI421 from Bacillus megaterium 142 / A. A. Fomenkov, V. M. Khamarov, L. V. Andreev et al.* // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 21.—P. 10399.
 10. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж.* Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—477 с.
 11. *Алексеев М. Ф., Гуньковская Н. В.* Метод быстрой трансформации энтеробактерий и некоторые факторы, влияющие на его эффективность // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.— С. 47—51.
 12. *Патон Е. Б.* Механизмы регуляции экспрессии генов рибосомных белков L11, L1, L10 и L7/12 *Escherichia coli*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Киев, 1990.—44 с.
 13. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.—436 с.
 14. *Characterization of the genes coding for the EcoRV restriction and modification system of Escherichia coli / L. Bougeleret, M. Schwarzstein, A. Tsugita, M. Zabeau* // Nucl. Acids. Res.—1984.—12, N 8.—P. 3659—3676.
 15. *Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives. A review / P. Balbas, X. Soberon, E. Merino et al.* // Gene.—1986.—50, N 1.—P. 3—40.
 16. *A bacterial clone synthesising proinsulin / L. Villa-Komaroff, A. Efstradiadis, S. Broome et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 8.—P. 3727—3731.
 17. *Maloy S. R., Nunn S. R.* Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1981.—145, N 2.—P. 1110—1112.
 18. *Craine B. L.* Novel selection for tetracycline- or chloramphenicol-sensitive *Escherichia coli* // Ibid.—1982.—151, N 1.—P. 487—490.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев
Ин-т биохимии и физиологии
микроорганизмов АН РФ, Пушкино

Получено 01.04.92

УДК 577.21

**Т. Н. Шевченко, А. В. Рой, А. Ю. Мирюта,
Н. А. Клименко, Т. П. Перерва**

СКРИНИНГ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК В ШТАММАХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

Ряд штаммов Bacillus subtilis, Pseudomonas alcaligenes, Ps. putida проанализирован с целью детекции плазмидных ДНК. Показано, что штаммы, обладающие способностью утилизировать поверхностно-активные вещества, содержат плазмидные ДНК. Это же свойство в отношении мочевины не коррелирует с наличием плазмид и, по-видимому, кодируется хромосомными генами.

Введение. Очистка сточных вод промышленных предприятий от вредных примесей — важная экономическая задача, решение которой представляется весьма перспективным с использованием микроорганизмов. В настоящее время для утилизации поверхностно-активных веществ, а также мочевины, являющихся загрязняющими примесями сточных вод

© Т. М. Шевченко, А. В. Рой, А. Ю. Мирюта, Н. А. Клименко, Т. П. Перерва, 1992