



УДК 577.11 : 547.963.32.04

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ПЛАЗМИД
H. HALOBIIUM В *E. COLI* И СТАБИЛЬНОСТЬ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД

Патон Е. В., Ходкова Е. М., Свердлов Е. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

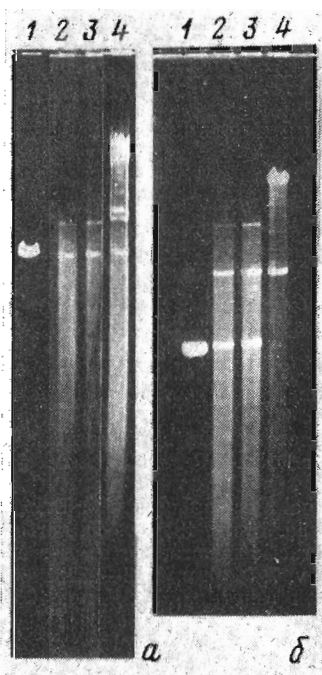
H. halobium, организм, приспособленный к существованию в экстремальных условиях, обладает важной отличительной особенностью — способностью к синтезу специального мембранного белка бактериородопсина. Есть сведения, что гены, кодирующие эту молекулу, локализованы в составе плазмид.

Плазмиды *H. halobium* представлены незначительным числом копий на клетку [1] и трудно выделяются, поэтому для исследования структуры генов, локализованных в этих плаزمиде и ответственных за синтез мембранных белков, весьма желательно клонировать их фрагменты в один из многокопийных векторов *E. coli*, например pBR 322. Однако, поскольку *H. halobium* существует в условиях, резко отличающихся от условий обитания *E. coli*, было неясно, насколько возможен перенос ДНК *H. halobium* в *E. coli*, и, если возможен, то насколько стабильны будут рекомбинантные плазмиды в штаммах *E. coli*. Ранее мы провели сопоставление плазмид из разных штаммов *H. halobium* и идентифицировали их рестрикционные фрагменты, одинаковые в штаммах, синтезирующих родопсин, и исчезающие в штамме, дефектном по этому признаку [2].

В данной работе мы провели клонирование этих фрагментов в *E. coli* и исследовали стабильность полученных рекомбинантных плазмид.

Плазмиды *H. halobium* R₁ и дикого типа расщепляли рестрикционной эндонуклеазой *Hind*III и гидролизаты разделяли препаративным электрофорезом в горизонтальном агарозном 0,8% геле [3]. Нужные фрагменты выделяли электроомагнием [4]. Фрагмент лигировали с pBR 322, расщепленной *Hind*III, в следующих условиях.

К 1,5 мкг фрагмента и 0,3 мкг pBR 322 добавляли 0,5 ед. T4-ДНК-лигазы. Инкубацию проводили в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,4–7,6), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит и 0,5 мМ АТФ, в течение 12 ч при 12,5° С. Концентрация ДНК-вектора составляла 10 мкг/мл. Смесь использовали непосредственно для трансформации клеток НВ 101, обработанных СаCl₂ по методу [5]. Было получено 5 · 10⁵ Ap^rTc^s-колоний на 1 мкг вектора. Из 40 колоний выделяли плазмиды по методу [6] и проводили их скрининг электрофорезом в 0,8% агарозном геле в сопоставлении с pBR 322. Плазмиды, подвижность которых соответствовала ожидаемой, исходя из суммы молекулярных весов клонируемого фрагмента и pBR 322,



Электрофорез в 0,8% агарозном геле [3] расщепленных рестриктазой *Hind*III рекомбинантных плазмид, содержащих фрагменты ДНК из плазмид *H. halobium* дикого типа (колонка 3), *H. halobium* R₁ (колонка 2), а также плазмид рBR 322 (1) и *H. halobium* R₁ (4)

подвергали дальнейшему анализу путем расщепления эндонуклеазой *Hind*III с последующим электрофорезом гидролизата в 0,8–1% геле. Для исследования стабильности плазмид клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды, инкубировали при 37°С в среде М9 [7] при качании. Через 24 ч 0,05 мл культуры переносили в 3 мл свежей среды и продолжали инкубацию. После каждой инкубации аликвоты смеси высевали на две чашки Петри с 1,5% агаром, одна из которых содержала ампициллин (40 мкг/мл). Проводили сопоставление числа колоний на обеих чашках. После 10 переносов культуры из клеток выделяли рекомбинантные плазмиды и анализировали их расщеплением эндонуклеазой *Hind*III.

Результаты экспериментов показывают, что фрагмент из плазмид *H. halobium* может быть клонирован в плазмиду рBR 322 *E. coli* (рисунок, а). Полученные рекомбинантные штаммы сохраняют признак ампициллин-устойчивости в отсутствие селективного давления на протяжении длительного времени (таблица). Сами рекомбинантные плазмиды за это

Исследование стабильности признака ампициллин-устойчивости штаммов *E. coli* НВ 101, содержащих рекомбинантные плазмиды (рBR 322 с фрагментами плазмиды из *H. halobium* дикого типа и R₁)

Штамм — источник фрагмента	Пассажи *					
	3		6		10	
	А	Б	А	Б	А	Б
R ₁	10	19	120	126	30	43
R ₁	23	25	150	195	23	21
R ₁	12	18	147	135	30	30
Длкий тип	122	130	30	22	20	22
Контроль (рBR 322 без вставок)	18	21	65	80	20	16

* Приведено количество колоний, выросших на одной чашке (А — чашки с ампициллином, Б — без ампициллина).

время не претерпевают изменений и сохраняют встроенный фрагмент (рисунк, б). Таким образом, клонирование в *E. coli* может использоваться для получения индивидуальных фрагментов ДНК *H. halobium*.

Авторы благодарны акад. Ю. А. Овчинникову за внимание и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weidinger G., Klotz G., Goebel W. A large plasmid from *Halobacterium halobium* carrying genetic information for gas vacuole formation.— *Plasmid*, 1979, v. 2, № 3, p. 377—386.
2. Патон Е. В., Ходкова Е. М., Гурьева Н. М., Свердлов Е. Д. Исследование плазмид из различных штаммов *H. halobium*.— *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 10, с. 1532—1537.
3. McDonell M. W., Simon M. N., Studier F. W. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.— *J. Mol. Biol.*, 1977, v. 110, № 1, p. 119—146.
4. Cohen S. N., Chang A. C. J., Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, № 8, p. 1210—1214.
5. Edgell M. N., Polsky F. I. Use of preparative gel electrophoresis for DNA fragment isolation.— In: *Methods in Enzymol.* N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 65, part 1, p. 319—327.
6. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.— *Nucl. Acid. Res.*, 1979, v. 7, № 6, p. 1513—1523.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 393.

Поступило в редакцию
29.V.1981

CLONING OF A *H. HALOBIUM* PLASMID *HINDIII* FRAGMENT IN *E. coli* AND STABILITY OF THE RECOMBINANT PLASMIDS

PATON E. V., KHODKOVA E. M., SVERDLOV E. D.

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

The *Hind III* fragment of *H. halobium* plasmid DNA have been cloned in *E. coli* using pBR322 plasmide as a vehicle. The recombinant plasmid obtained was stable in *E. coli* without selective pressure.