



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3332486/30-15

(22) 06.08.81

(46) 15.12.85. Бюл. № 46

(71) Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР

(72) В. И. Тяншин, А. С. Солонин,
Б. М. Трояновский и А. А. Баев

(53) 575.113:577.15(088.8)

(56) Velten J., Abelson J. J. No1.
Biol., 1980, 137, 235-248.

Wilson G. G., Murray N. E.
J. Mol. Biol., 1979, 132, 471-492.

Panet A. et al., Biochemistry,
1975, 12, 5045-5050.

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК
pILL435, КОДИРУЮЩАЯ СИНТЕЗ ДНК-ЛИ-
ГАЗЫ ФАГА T4, СПОСОБ ЕЕ КОНСТРУИРО-
ВАНИЯ И ШТАММ E.coli ВКМ В-1449 -
ПРОДУЦЕНТ ДНК-ЛИГАЗЫ ФАГА T4.

(57) 1. Рекombинантная плазмидная
ДНК pILL435, кодирующая синтез ДНК-
лигазы фага T4, состоит из следую-
щих элементов:

- плазмидная ДНК вектора pBR322,
размер которой 4,36 тпо,
- HindIII-EcoRI - фрагмент, содер-
жащий часть гена ДНК-лигазы фага
T4 (0,7 тпо),
- два EcoRI фрагмента ДНК фага T4
(0,5 и 0,4 тпо), включающие
часть гена ДНК-лигазы T4 с соб-
ственным промотором,
- EcoRI-EcoRV - фрагмент ДНК фага
лямбда (1,0 тпо) из района между
26780 и 27800 парами нуклеотидов
генома фага лямбда,
- BamHI-BglII - фрагмент фага лямбда
(1,2 тпо), содержащий P_L про-
мотор и читактный ген N фага лямбда,

- два BglIII фрагмента (2,4 и 0,6 тпо),
содержащие гены регуляторов транс-
крипции с ранних промоторов фага
лямбда с мутациями c1857 (t's) и
cro амб и промоторы P_{RE}, P_{RM}, P_R,
- фрагменты содержат следующие гены:
bla - ген, обеспечивающий синтез
β-лактамазы,
lig T4 - ген ДНК-лигазы фага T4,
N - ген фага лямбда - антитермина-
тор транскрипции,
rex - ген, запрещающий размножение
rll мутантов фага T4,
c1 - репрессор фага лямбда,
cro - второй репрессор фага лямбда
и промоторы P_{BR3}, P_L, P_T,
P_m, P_{ig},
- молекулярная масса рекомбинантной
плазмидной ДНК равна 7,1 Мд (раз-
мер - 11,1 тпо).

2. Способ конструирования реком-
бинантной плазмидной ДНК pILL435,
кодирующей синтез ДНК-лигазы фага
T4, заключающийся в том, что смесь
плазмидной ДНК pBR322 и ДНК фага
λNM 816-1 подвергают совместному
гидролизу эндонуклеазами рестрикции
HindIII и EcoRV, полученные фраг-
менты соединяют ДНК-лигазой, затем
смесью рекомбинантных молекул транс-
формируют клетки E.coli lig ts7,
трансформанты высевают на среду с
ампициллином и из выросших при не-
пермиссивных условиях клонов выделя-
ют рекомбинантную плазмидную ДНК,
содержащую полный ген ДНК-лигазы
фага T4, затем полученную ДНК гидро-
лизуют эндонуклеазой рестрикции
BamHI, продукты гидролиза с помощью
ДНК-лигазы соединяют с BamHI-BglII -
фрагментами ДНК фага λ c1857 cro

лямбда, после трансформации клеток *E. coli* отбирают клоны с иммунитетом к суперинфицирующему фагу лямбда и из них выделяют рекомбинантную плазмидную ДНК pILL435.

3. Штамм *Escherichia coli* ВКМ В - 1449Д (Всесоюзная коллекция микроорганизмов при ИБФМ АН СССР) - продуцент ДНК-лигазы фага T4..

1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и молекулярной биологии и представляет собой рекомбинантную плазмидную ДНК, обуславливающую синтез ДНК-лигазы фага T4, способ конструирования данной рекомбинационной плазмидной ДНК и штамм, содержащий эту рекомбинантную плазмиду - суперпродуцент ДНК-лигазы фага T4.

ДНК-лигаза фага T4 - один из основных ферментов, используемых в генетической инженерии при конструировании гибридных молекул.

Известны рекомбинантные ДНК, определяющие синтез ДНК-лигазы фага T4. Описанная в работе плаزمиды включает ДНК векторной плазмиды pBR313 и фрагмент ДНК фага T4, содержащий полный ген ДНК-лигазы с собственным промотором. Описанная рекомбинантная плазмиды не обеспечивает достаточно высокий уровень лигазной активности (см. табл. 1).

В работе [2] был сконструирован рекомбинантный фаг λ , содержащий полный ген ДНК-лигазы фага T4.

Эффективный синтез ДНК-лигазы фага T4, осуществляемый с промотора P_{λ} , векторного фага, обуславливал в 300 раз более высокое содержание этого фермента в сравнении с клетками *E. coli*, инфицированными фагом T4⁺. Однако одновременно в инфицированных клетках рекомбинантный фаг продуцирует сопутствующие ферменты, например λ -экзонуклеазу - фермент, который значительно затрудняет очистку основного продукта.

Известный способ конструирования рекомбинантной плазмиды, содержащей ген ДНК-лигазы фага T4, описанный в работе [1], состоит в том, что фрагменты ДНК фага T4, продуцируемые эндонуклеазой рестрикции HindIII,

2

объединяют с мультикопийной векторной плазмидой pBR131, предварительно гидролизованной эндонуклеазой рестрикции HindIII. Гибридными плазмидами трансформируют клетки *E. coli* lig ts7, у которых при повышенной температуре не функционирует ДНК-лигаза. Трансформанты с искомыми рекомбинантными плазмидами выращивают при температуре, непермиссивной для роста клеток *E. coli* lig ts7. Из выросших клеток выделяют плазмидную ДНК, структуру которой исследуют рестрикционным анализом. Было показано наличие в рекомбинантных плазмидах фрагмента размером 1,9 тпо (тысяч пар оснований), включающего полный ген ДНК-лигазы фага T4. Однако содержание этого фермента в клетках в этом случае низкое (см. табл. 1).

К недостаткам данного способа можно отнести также то, что для конструирования рекомбинантной плазмиды не используют фрагменты ДНК, которые содержат промоторы, обеспечивающие высокий уровень синтеза ДНК-лигазы.

Применяемый в работе способ получения рекомбинантной ДНК предусматривает использование ДНК фага NM816 в качестве вектора. Фрагменты ДНК T4, продуцируемые рестриктазой EcoRI при ограниченном гидролизе, вводят в ДНК этого фага и отбирают фаги, которые размножаются на *E. coli* lig ts7 при 37°C и образуют лизогены при 43°C. Были обнаружены рекомбинанты, содержащие ген ДНК-лигазы фага T4. Эти рекомбинантные фаги получены введением в вектор трех EcoRI - фрагментов ДНК фага T4, включающих полный ген ДНК-лигазы. Синтез ДНК-лигазы проходил после индукции профага, которую проводят следующим образом: лизогенные клет-

ки подращивают при температуре 30°C до титра $3,5 \cdot 10^5$ кл/мл, инкубируют 15 мин при 43°C, затем культивируют клетки при 37°C в течение 3 ч. Однако способ конструирования рекомбинантного фага лямбда с полным геном лигазы не обеспечивает получения штамма *E. coli* с достаточно высоким содержанием ДНК-лигазы фага T4.

Способ конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей полный ген ДНК-лигазы фага T4 и регуляторную область фага лямбда, в литературе не описан.

Известны следующие штаммы-продуценты ДНК-лигазы фага T4 (см. табл. 1):

а) клетки *E. coli* В, инфицированные фагом T4 am N82, которые содержат по нашим данным 168 единиц фермента на грамм биомассы;

б) штамм *T. coli* K802, несущий плазмиду рTFN3012 с HindIII фрагментом ДНК фага T4, включающим ген ДНК-лигазы фага T4. Штамм имеет низкий уровень синтеза фермента [1];

в) штамм *E. coli* NM989 является производным от штамма *E. coli* AA125, лизогенным по фагу λ c1857 W am 403, E am 1100 S am100 T4 lig, который несет ген ДНК-лигазы фага T4 [2] и обеспечивает при термоиндукции уровень синтеза ДНК-лигазы фага T4, равный 4800 единиц на грамм клеток.

Уровень синтеза ДНК-лигазы T4 в перечисленных штаммах недостаточно высок. Кроме того, перечисленные штаммы (а) и (в) продуцируют сопутствующие ферменты, которые усложняют способ получения ДНК-лигазы, что увеличивает время очистки и снижает выход конечного продукта.

Целью предлагаемых объектов изобретения является увеличение содержания ДНК-лигазы фага T4 в клетках бактерий.

На фиг. 1 изображена схема рекомбинантной плазмидной ДНК pILL 435 с рестрикционной и генетической карти (P_L → — обозначение основных промоторов и направление транскрипции); на фиг. 2 — электрофореграмма фрагментов ДНК рекомбинантной плазмиды pILL 435, полученных при гидролизе эндонуклеазами рестрикции BglIII (1), EcoRI (2), HindIII (3) и при совместном гидролизе Bam HI и HpaI (4), HindIII и EcoRV (5), Sall и HpaI (6); электрофореграмма Bam HI — фрагментов ДНК λ (7),

EcoRII — фрагментов ДНК pBR 322 (8), BamHI — Bgl III — фрагментов ДНК pIL 203 (9); слева приведены размеры фрагментов ДНК pILL 435, справа отмечены размеры маркеров (в тыс. пар оснований); на фиг. 3 — схема конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pILL 435, обеспечивающей синтез ДНК-лигазы T4; на фиг. 4 — электрофореграмма частично очищенных с помощью фосфоцеллюлозы P-11 (пример 1) белков из экстрактов клеток: *E. coli* AA125/pBP 322 lig 35 (2) *E. coli* AA125 (T4 lig C1857 Wam 403 Eam 1100 Sam 100) (3) *E. coli* AA125/pILL 435 (4) Электрофореграмма очищенного фермента ДНК-лигазы T4 (5) и белковых маркеров с обозначенными размерами (1) Рекомбинантная плазмидная ДНК pILL435, кодирующая ДНК-лигазу фага T4, состоит из следующих элементов: — плазмидная ДНК вектора pBR322, размер которой 4,36 тпо, — HindIII-EcoRI — фрагмент, содержащий часть гена ДНК-лигазы фага T4 (0,7 тпо), — два EcoRI — фрагмента ДНК фага T4 (0,5 и 0,4 тпо), включающие часть гена ДНК-лигазы T4 с собственным промотором, — EcoRI-EcoRV — фрагмент ДНК фага лямбда (1,0 тпо) из района между 26780 и 27800 парами нуклеотидов генома фага λ , — BamHI-BglIII — фрагмент фага лямбда (1,2 тпо), содержащий P_L промотор и интактный ген N фага лямбда, — два BglIII — фрагмента (2,4 и 0,6 тпо), содержащие гены регуляторов транскрипции с ранних промоторов фага лямбда с мутациями c1857 (ts) и cro am6 и промоторы P_{RE}, P_{RR}, P_R. Молекулярная масса гибридной плазмиды pILL435 равна 7,1 Мд (размер 11,1 тпо) (фиг. 1, 2). Для достижения цели используют способ конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК, кодирующей ДНК-лигазу фага T4, заключающийся в том, что смесь плазмидной ДНК pBR322 и ДНК фага λ NM816-1 подвергают совместному гидролизу эндонуклеазами рестрикции HindIII и EcoRV, образовавшиеся фрагменты соединяют

ДНК-лигазой, затем полученной смесью трансформируют клетки *E. coli* lig ts7, трансформанты высевают на среду с ампициллином и из выросших при непермиссивных условиях клонов выделяют рекомбинантную плазмидную ДНК, содержащую полный ген ДНК-лигазы фага T4, затем полученную ДНК гидролизуют эндонуклеазой рестрикции BamHI, продукты гидролиза с помощью ДНК-лигазы соединяют с BamHI и BglII-фрагментами ДНК фага λ c1857 cro am6, после трансформации клеток *E. coli* отбирают клоны с иммунитетом к суперинфицирующему фагу лямбда и из них выделяют рекомбинантную плазмидную ДНК pILL435 (фиг. 3).

Выбор штамма *E. coli* lig ts7 обусловлен тем, что клетки *E. coli* lig ts7, содержащие рекомбинантные плазмиды с интактным геном ДНК-лигазы T4, способны расти при 43 С в отличие от клеток *E. coli* lig st7, не содержащих рекомбинантные плазмиды с полным геном ДНК-лигазы фага T4.

Для достижения цели используют штамм *Escherichia coli* ВКМ В-1449Д (Всесоюзная коллекция микроорганизмов при ИБФМ АН СССР) - продуцент ДНК-лигазы фага T4.

Штамм-продуцент ДНК-лигазы фага T4 получен трансформацией клеток *E. coli* AA125 плазмидой pILL435. Содержание ДНК-лигазы фага T4 в сконструированном штамме равно 50000 единиц на 1 г биомассы клеток. Штамм депонирован во Всесоюзной коллекции микроорганизмов при ИБФМ АН СССР под номером ВКМ В-1449Д.

Штамм *Escherichia coli* ВКМ В-1449Д характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки: клетки прямые, палочковидной формы 1,2-1,6 x 2,0 x 6,0 мк, подвижные, с перитрихальными жгутиками, грам-отрицательные, неспорозные.

Культуральные признаки: клетки хорошо растут на простых питательных средах. При росте на мясо-пептонном агаре, питательном агаре "Дифко" - колонии гладкие, круглые, прижаты, блестящие, серые, край ровный, мутные. При росте в жидких средах - мясо-пептонном бульоне, I.B-бульоне образует ровную интенсивную муть.

физиолого-биохимические признаки: клетки растут в пределах от 4 до 45°C при оптимуме pH от 6,8 до 7,5. В качестве источника углерода используют многие углеводы, спирты, органические кислоты, в частности: d-глюкозу, d-фруктозу, арабинозу, лактозу, трегалозу. Не усваивают ацетат, аданит, галактозу. В качестве источника азота используют как минеральные соли в аммонийной и нитратной форме, так и в органической форме в виде пептона, аминокислот. Нитраты восстанавливают до нитритов. Желатину не разжижают. Индол не образуют. Уреазная активность не обнаруживается.

Устойчивость к антибиотикам: проявляет устойчивость к ампициллину, обусловленную наличием плазмиды pILL435.

Штамм *E. coli* ВКМ В-1449Д проявляет иммунитет к суперинфицирующему фагу лямбда.

Пример 1. Клетки бактерий *E. coli* K802, содержащие плазмидную ДНК pBR322, выращивают в 10 мл бульона до титра 1×10^8 кл/мл. Клетки осаждают центрифугированием (5.000g, 5 мин, +4°C) и ресуспендируют в 0,1 мл лизирующего раствора (лизосим - 2 мг/мл, трис-HCl, pH 8,0-25 мМ, ЭДТА - 10 мМ, глюкоза - 50 мМ), выдерживают 5 мин при 0°C. Далее прибавляют 0,2 мл раствора (NaOH - 0,2 N, додецилсульфат натрия - 1%) и перемешивают до осветления лизата. 150 мкл раствора 3 M ацетата натрия (pH 4,8) вносят в осветленный лизат, осторожно перемешивают до заметного снижения вязкости раствора, выдерживают 1 ч при +4°C и образовавшийся осадок отделяют центрифугированием (1000g, 5 мин, +4°C). К полученному супернатанту добавляют 2,5 объема охлажденного при -40°C этилового спирта и выдерживают 2 ч при -40°C. Образовавшийся осадок собирают центрифугированием (5000g, 5 мин, 20°C) и ресуспендируют в 0,2 мл буфера (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА).

Препарат вирионов фага NM816-1 получают инфекцией экспоненциально растущей культуры *E. coli* C600 с множественностью 1 в среде LB (10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 л воды), содержащей 10^{-3} M MgSO₄. Лизис клеток завершают добавлением в среду хлоро-

форма (1:100). После удаления обломков клеток центрифугированием (6000g, 30 мин, 4°C) клеточные ДНК и РНК лизата гидролизуют одновременно панкреатическими ДНКазой и РНКазой (по 10 мкг/мл) при 20°C, 1 ч. Первичную очистку и концентрирование фага проводят с помощью полиэтиленгликоля 6000 (Jomamoto K. R. et al., *Virology*, 40, 734-744, 1970). Окончательную очистку фага проводят равновесным центрифугированием в 4 М CsCl, 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 0,01 М MgCl₂ (Wilson G. G. et al., *Molec. Gen. Genet.*, 156, 203-214, 1977). Очищенный препарат фага NM16-1 диализуют против буфера (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА).

ДНК фага NM816-1 выделяют фенольным методом (Таняшин В. И. и др., *Мол. биол.*, 6, 803-815, 1974). Концентрацию ДНК фага и плазмиды определяют спектрофотометрически при 260 нм с использованием коэффициента экстинкции 0,02 см²/мкг. Плазмидную ДНК выделяют по методу Birnboim H. C., Doly J., *Nucl. Acids Res.*, 1979, 7, N 6, 1513-1523.

Полученные препараты ДНК плазмиды pBR322 и фага NM816-1 используют для конструирования рекомбинантной плазмиды pBR322 lig 35 (схема фиг. 3), которое проводят следующим образом: 0,5 мкг ДНК плазмиды pBR322 смешивают с 3 мкг ДНК фага NM816-1 и инкубируют с эндонуклеазами рестрикции HindIII (5 ед.) и EcoRV (5 ед.) в буфере А (50 мМ трис-НСl, рН 7,6, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол). Реакцию проводят при 37°C 1 ч. После инкубации смесь прогревают при 65-70°C 10 мин. Анализ полноты гидролиза проводят с помощью электрофореза. Соединение фрагментов ДНК плазмиды и фага проводят в буфере А с добавлением АТФ и дитиотрейтола до конечной концентрации 0,5 мМ и 5 мМ соответственно, и ДНК-лигазы фага T4 (3000 ед./мл) из расчета 1 мкл фермента на 5 мкг ДНК 8-10 ч при 8°C, затем смесь разводят в 10 раз буфером А с повторным добавлением ДНК-лигазы фага T4 и инкубируют смесь 10 ч. Полученную смесь рекомбинантных плазмид используют для трансформации клеток *E. coli* lig ts7. Трансформацию проводят следующим образом: 0,1 мл суспензии клеток

E. coli lig ts7 вносят в 10 мл питательного бульона LB и выращивают до титра 3×10^8 кл./мл. После 10-минутного охлаждения (0°C) клетки собирают центрифугированием (5000g, 10 мин, 0°C), суспендируют в 10 мл 0,1 М раствора CaCl₂ и выдерживают 1 ч. Клетки повторно центрифугируют (5000g, 10 мин, 0°C), затем ресуспендируют в 0,5 мл 0,1 М CaCl₂ (0°C) и используют для трансформации через 10-15 ч.

Смесь соединенных фрагментов ДНК инкубируют с компонентными (обработанными CaCl₂) клетками 1 ч при 0°C и 10 мин при комнатной температуре (18 - 22°C). После десятикратного разбавления бульоном LB трансформированные клетки подрашивают 2 ч и высевают на агаризованную среду LB с ампициллином (20 мкг/мл). Трансформанты отбирают при непермисивной для исходных клеток *E. coli* lig ts7 температуре (43°C). Из клеток, выросших за 24 ч клонов, выделяют плазмидную ДНК по методике, описанной выше.

Плазмидную ДНК, содержащую полный ген ДНК-лигазы фага T4 и обозначенную pBR322 lig35, используют в качестве реципиента при конструировании плазмиды pILL435 (схема фиг. 3). В качестве донора регуляторной области фага лямбда используют ДНК фага λ c1857 cro am6. Препарат вирионов этого фага получают термоиндукцией лизогенной культуры *E. coli* C600 (λ c1857 cro am6), которую проводят следующим образом: лизогенную культуру подрашивают при 30°C до титра 3×10^8 кл./мл, затем инкубируют при 43°C 15 мин и продолжают выращивание при 37°C 1 ч с эффективной аэрацией. Лизис клеток завершают добавлением в среду хлороформа (1/100). Дальнейшую очистку фага и выделение ДНК проводят по методике, описанной в этом примере выше.

Полученные препараты ДНК плазмиды pBR322 lig35 обрабатывают эндонуклеазами рестрикции BamHI, а ДНК фага λ c1857 cro am6 гидролизуют одновременно эндонуклеазами рестрикции BamHI и BglII. Полученные фрагменты ДНК плазмиды и фага смешивают в соотношении 1:10 и соединяют ДНК-лигазой фага T4 по методике, описанной выше (схема фиг. 3). После трансформации компетентных клеток *E. coli*

К802 отбирают клоны с иммунитетом к суперинфицирующему фагу лямбда. В данном эксперименте используют фаги, перечисленные в табл. 2.

Из клеток клонов, обеспечивающих иммунитет к фагу лямбда, известными методами выделяют плазмидную ДНК, обозначенную нами pILL435 и содержащую в своем составе три фрагмента области иммунитета фага лямбда, которые образуются при совместном гидролизе фаговой ДНК эндонуклеазами рестрикции BamHI и BglII (фиг. 1 и 3).

Анализ генетических маркеров в рекомбинантных плаزمиде проводят следующим образом.

Резистентность к ампициллину клеток штамма *E. coli* lig ts7, содержащих плазмиду pILL 435, анализируют на агаризованной среде с содержанием ампициллина от 10 до 100 мкг/мл. Данные клетки растут на средах с этой концентрацией ампициллина.

Наличие в клетках, содержащих плазму pILL435, репрессора фага лямбда, обуславливающего иммунитет клеток к суперинфицированию гомоиммунными фагами лямбда, устанавливают следующим образом: клетки из отдельных клонов высевают в 1 мл МПБ и после выращивания до титра $2 \cdot 10^8 - 6 \cdot 10^8$ кл/мл наносят микробиологической петлей на чашку с твердым агаром в виде полосы; после 5-минутного подсушивания (20°C) аккуратно наносят петлей суспензию различных фагов с титром 1-5х 10^8 б.е./мл⁺ и затем инкубируют при 30°C 6-8 ч.

Для проверки наличия репрессора используют фаги 434 imm λ , λ imm21, λ b₂, λ c126, λ c1857, λ vir, λ imm434, а также фаги T4⁺ и T4 rII. Результаты исследования даны в табл. 3. Знаком + отмечены фаги, способные размножиться на анализируемой культуре.

Из результатов, приведенных в табл. 3, следует, что плазмиды pILL435 действительно содержит гены области иммунитета фага лямбда. Отсутствие роста фага T4 rII на штамме, содержащем плазмиду pILL435, доказывает наличие в плазмиде функционирующего гена rex фага лямбда. Для анализа одновременного присутствия мутаций в генах c1 и cro проводят рекомбинацию in vivo меж-

ду плазмидами и фагом λ imm434 c⁺, который образует негативные колонии с мутным центром за счет эффективной лизогенизации.

- 5 Штаммы, содержащие плазмиды, выращивают в 10 мл бульона до титра $1,6 \cdot 10^8$ кл/мл, при 30°C инфицируют фагом λ imm434 с множественностью 0,1, инкубируют при 30°C 4 ч, добавляют 1/100 часть (об/об) хлороформа и титруют на бактериальных газонах с клетками, содержащими и не содержащими фаг 434 в состоянии профага. Образование рекомбинантов дополнительно указывает на присутствие регуляторной области фага лямбда c1 в гибридных плаزمиде pILL435. Гибридный фаг, полученный при рекомбинации с плазмидой pILL435, образует на газоне клеток *E. coli* S600 при 37°C прозрачные негативные колонии, а при 30°C - мутные, что указывает на наличие термочувствительной мутации в гене c1 плазмиды pILL435.
- 10
15
20
25

- Анализ наличия в гибридных фагах супрессивной мутации в гене cro проводят сравнением эффективности титрования того фага на штаммах *E. coli* с различными супрессорными мутациями при 30 и 43°C. Результаты анализа (см. табл. 3) указывают на одновременное присутствие в плазмиде pILL435 мутаций в генах cro и c1, а также на различную степень супрессии этих мутаций в зависимости от типа супрессора, присутствующего в штамме (Oppenheim A., Oppenheim A. B. *Virology*, 75, 469-476, 1976).
- 30
35
40

- Из данных этой таблицы следует, что гибридная плазмиды pILL435 действительно содержит фрагмент ДНК фага лямбда с мутациями c1857 и crob.
- 45

- Клетки штамма *E. coli* lig ts7 из-за наличия термочувствительной мутации в гене бактериальной лигазы не способны расти при температуре 43°C. Трансформация клеток *E. coli* lig ts7 плазмидой pILL435 и последующие проверки роста трансформаторов при 30, 36, 43°C показывают, что клетки штамма *E. coli* lig ts7, содержащие плазмиду pILL435, приобретают способность расти при 43°C. В целом клетки *E. coli* lig ts7, содержащие рекомбинантные плазмиды
- 50
55

pILL435, обладает следующими признаками:

Резистентность к ампициллину;

Иммунитет к фагам λ c1 26,

λ^1 , 434imm λ , λ c1857;

Не способны поддерживать размножение фагов T4 rII;

Способны к росту при 43°C.

Определение активности ДНК-лигазы фага T4.

0,5 г биомассы *E. coli* ВКМ В-1449Д суспендируют в 3 мл лизирующего буфера 0,2 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, pH 7,5, 0,001 М восстановленного глутатиона, 100 мкг/мл лизоцима, выдерживают при 0°C 10 ч, озвучивают ультразвуком 4 раза по 30 с при 0°C, затем центрифугируют (22300g, 2 ч, 0°C). Супернатант наносят на колонки с фосфоцеллюлозой P11 (0,5 мл), предварительно уравновешенные буфером М (0,2 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ дитиотреитол), промывают этим буфером, фракции с активностью ДНК-лигазы элюируют буфером В, содержащим 0,7 М NaCl. Элюат собирают по 0,5 мл и в каждой фракции определяют активность ДНК-лигазы.

Реакционная смесь (20 мкл) содержит 5 пикомолей ³H-АТФ (40 Ки/мм), 10 СаCl₂, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и от 2 до 15 мкл отдельных фракций, элюированных с колонки. Пробы инкубируют при 20°C 5 мин. Реакцию останавливают перенесением на фильтр Whatman 3 MM с последующим немедленным погружением фильтра в холодный раствор 5%-ного ТХУ с 1%-ным пиррофосфатом натрия. После инкубации (15 мин при 0°C) раствор сливают, заменяют свежим и выдерживают при 0°C 10 мин. Фильтры промывают последовательно холодной водопроводной водой, спиртом, ацетоном, высушивают на воздухе и просчитывают радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. За 1 единицу фермента принимают количество ДНК-лигазы фага T4, необходимое для образования АМФ-лигазного комплекса с 1 пикомолем ³H-АМФ. При определении активности в штамме фракции, содержащие фермент, объединяют, разводят пробы и считают активность, учитывая разведение.

Кроме того, уровень синтеза ДНК-лигазы фага T4 анализируют электро-

форетически известными методами (Murray N. E. et al., J. Mol. Biol., 132, 493-506, 1979) в каждой отдельной и объединенных фракциях элюата (фиг. 4).

Пример 2. Плазмиду pILL435 формируют в штамм *E. coli* AA125 по методу, описанному в примере 1, и получают штамм-продуцент ДНК-лигазы фага T4 с активностью не менее 50000 ед/г биомассы клеток.

Для сравнения в табл. 4 приведены значения уровней синтеза ДНК-лигазы фага T4 в различных штаммах *E. coli*, содержащих рекомбинантную плазмидную ДНК pILL435.

Предлагаемые изобретения позволяют получить штамм *E. coli* - продуцент ДНК-лигазы фага T4. Уровень синтеза фермента в предлагаемом штамме *E. coli* AA125, содержащем рекомбинантную плазмиду pILL435, не менее 50000 единиц на 1 г сырого веса биомассы клеток, что в 10 раз выше уровня синтеза этого фермента в сравнении с лучшим из известных штаммов - *E. coli* NM989 (базовый объект, описанный в работе Murray N. E. et al., J. Mol. Biol., 132, 493, 1979). Полученный положительный эффект предлагаемых изобретений достигается за счет свойств сконструированной новым способом плазмиды pILL435 с полным геном ДНК-лигазы фага T4. Плаزمида pILL435 содержит раннюю область фага λ c1857 cro am6, что обеспечивает эффективный регулируемый синтез ДНК-лигазы фага T4, осуществляемый под контролем раннего промотора фага лямбда P_L (см. фиг. 1).

В данной плазмиде в отличие от ДНК фага NM989, используемого ранее, отсутствует ген λ -экзонуклеазы и другие фаговые гены, продукты которых затрудняют последующую очистку целевого продукта. В СССР и в других лабораториях мира для получения ДНК-лигазы до настоящего времени плазмиды, определяющая синтез ДНК-лигазы фага T4, не использовалась.

Предлагаемый способ конструирования плазмид дает возможность получить рекомбинантную плазмидную ДНК, обеспечивающую увеличение синтеза ДНК-лигазы фага T4. Использование HindIII-EcoRV - фрагмента ДНК фага NM816-1 позволяет выделить полный

ген ДНК-лигазы с собственным промотором и расположить его в непосредственной близости от промотора P_L . Регуляция транскрипции с данного промотора осуществляется генами регуляторами с 1857 и *cro am6*, входящими в состав области иммунитета фага λ . Плазмида pILL435 - автоном-

но реплицирующаяся система, не нуждающаяся подобно лизогенным фагам в индукции. Поэтому штамм, содержащий данную плазмиду, культивируется при постоянной температуре и не требует ступенчатого изменения температурных режимов при выращивании биомассы клеток.

Т а б л и ц а 1

Сравнение уровней синтеза ДНК-лигазы бактериофага T4 в различных штаммах E.coli

Штамм-продуцент	Активность, ⁺ ед/г биомассы
E.coli B, инфицированный бактериофагом T4 am NB2	168
E.coli 802, содержащий плазмидную pIFN3012 ДНК (1,9 тпо)	2
E.coli 802, содержащий плазмидную pBR322 lig 35 ДНК (2,9 тпо)	80
E.coli NM989	4800
E.coli AA125, содержащий плазмидную pILL435 ДНК (ВКМ В-1449Д)	50000

⁺ Определение активности ДНК-лигазы проводилось по методу Кнопфа (см. пример 1), Knopf R.W., Eur. J. Biochem., 73, 33-38, 1977.

Т а б л и ц а 2

Анализ генетических маркеров в клетках, содержащих и не содержащих рекомбинантную плазмиду pILL435

Штамм, у которого	λH_2	$\lambda imm434$	$\lambda imm21$	λvir	λcI^-	434imm λ	T4 ⁺	T4rII
Плазмида pILL435	-	+	+	+	-	-	+	-
Плазмида pILL435 отсутствует	+	+	+	+	+	+	+	+

⁺ б.е./мл - бляшкообразующие единицы в мл.

Т а б л и ц а 3

Эффективность титрования фагов лямбда с мутациями
в генах репрессоров в различных условиях

Бактериофаг	30/38 ⁺			43/38 ⁺⁺		
	W3350	C600	QD 5003	W 3350	C600	QD5003
λc1857	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
λc1857 cro амб	0,05	0,47	-	0,03	0,15	-
λimm434 X pILL435	0,052	0,4	0,08	0,05	0,1	0,01

⁺ отношение титров фага при температуре 30 и 38^oС;

⁺⁺ отношение титров фага при температурах 43 и 38^oС.





Т а б л и ц а 4

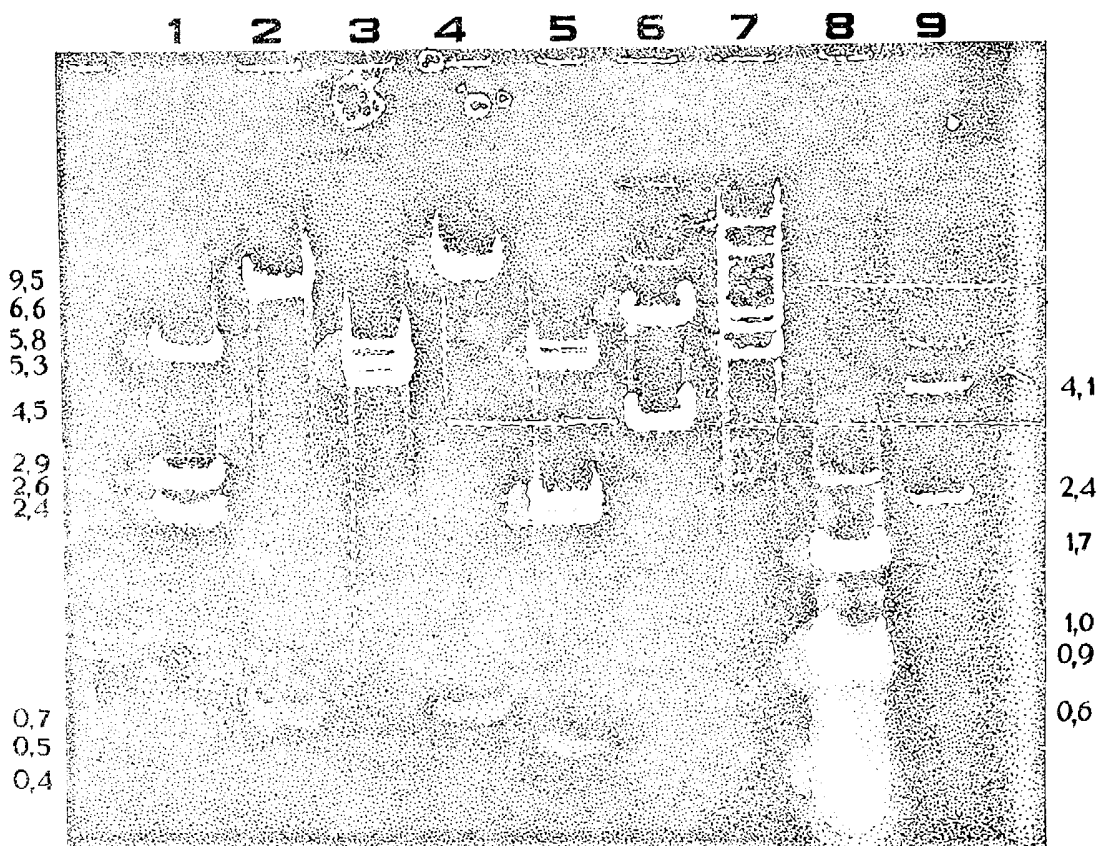
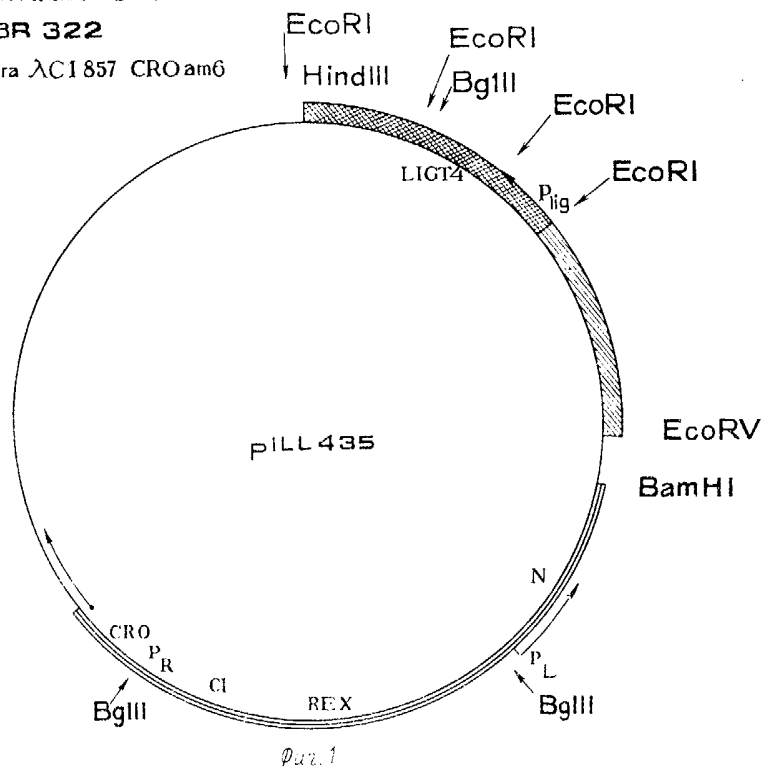
Уровень синтеза ДНК-лигазы фага T4 в различных штаммах
E.coli, содержащих рекомбинантную плазмидную ДНК pILL435

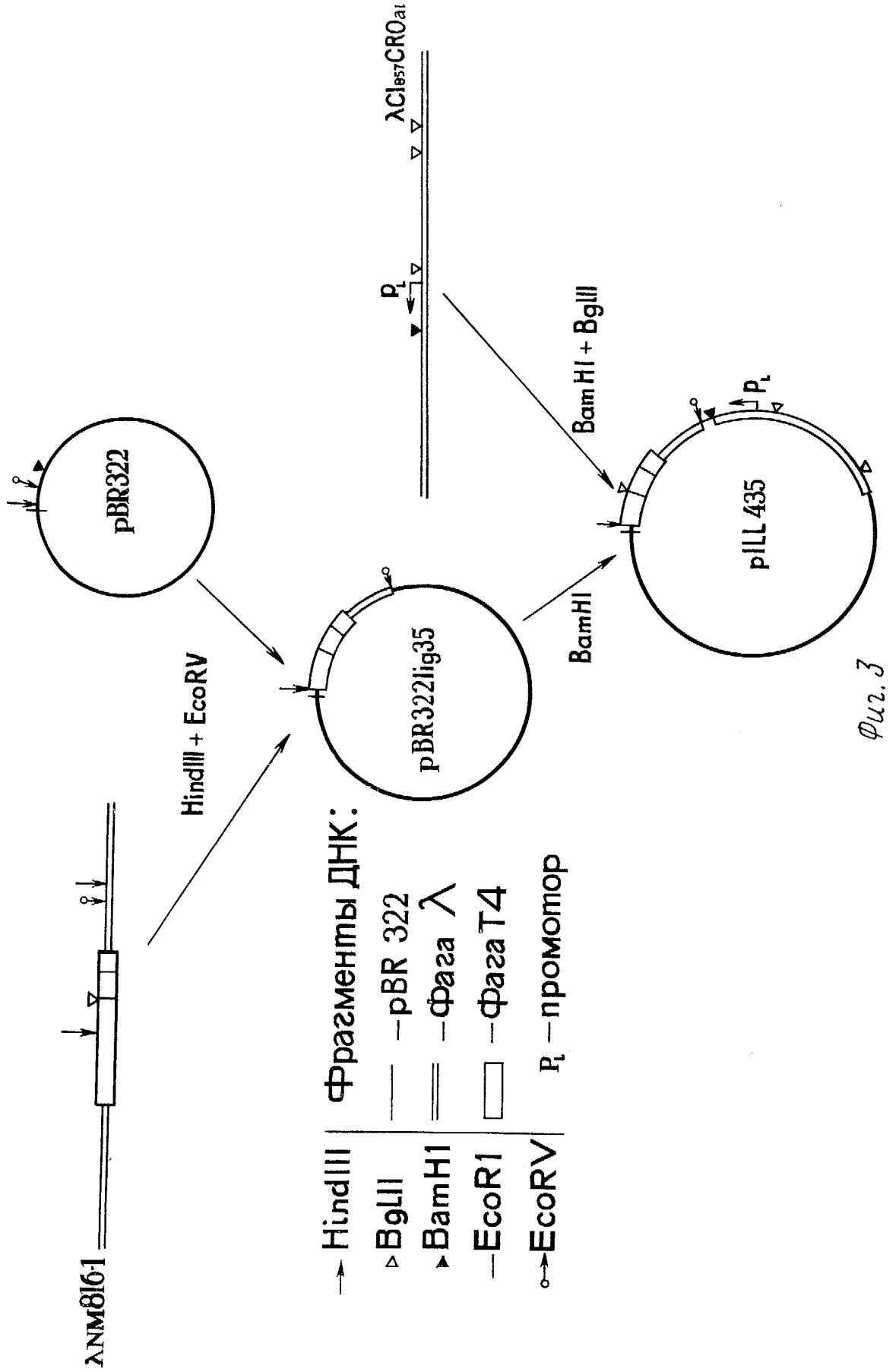
Но- мер	Штамм ⁺	Активность ед. Кнопфа
1	E.coli QD5003/pILL435	10000
2	E.coli Sul/pILL435	17000
3	E.coli 802/pILL435	40000
4	E.coli C600/pILL435	44000
5	E.coli AA125/pILL435=ВКМ В-1449Д	50000

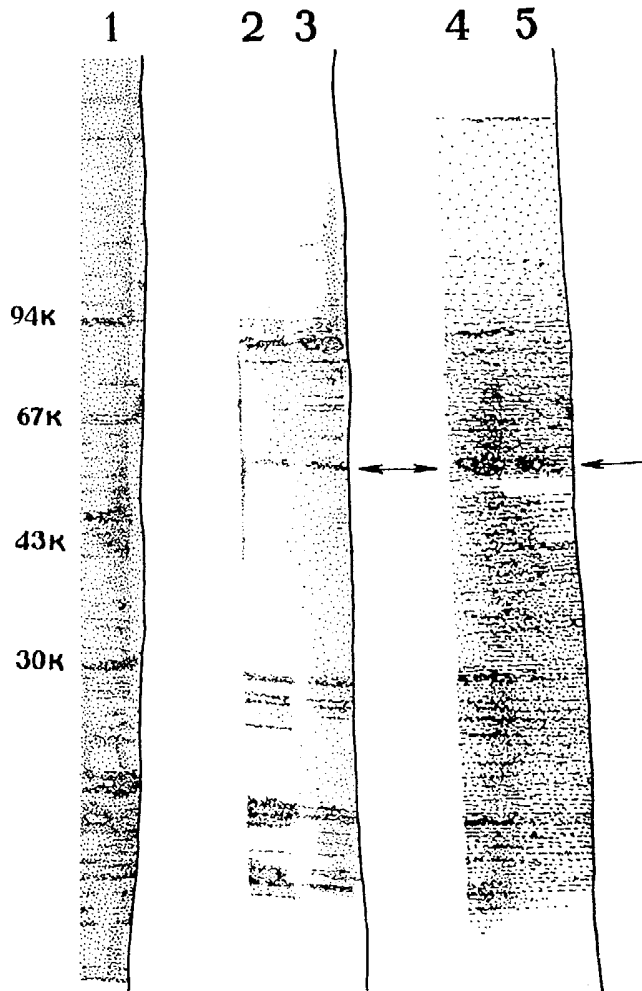
⁺ Штаммы получены трансформацией плазмиды
pILL435 (см. пример 1).

Фрагменты ДНК:

-  Фара Т4
-  Фара λNM816-1
-  рВВ 322
-  Фара λC1857 CROam6







Фиг. 4

Редактор П. Горькова Техред О. Ващишина Корректор Е.Рошко

Заказ 8128/2 Тираж 524 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4