

18. *A. Petunia hybrida* chloroplast DNA region close to one of the inverted repeats shows sequence homology with the *Euglena gracilis* chloroplast DNA region that carries the putative replication origin // J. M. de Haas, K. J. M. Boot, M. A. Haring et al. // Mol. and Gen. Genet.—1986.—202, N 1.—P. 48—54.
19. Koller B., Delius H. Origin of replication in chloroplast DNA of *Euglena gracilis* located close to the region of variable size // EMBO J.—1982.—1, N 4.—P. 995—998.
20. Schlunegger B., Stutz E. The *Euglena gracilis* chloroplast genome: structural features of a DNA region possibly carrying the single origin of DNA replication // Curr. Genet.—1984.—8, N 6.—P. 629—634.
21. Ravel-Chapius P., Heizmann P., Nigon V. Electron microscopic localization of the replication of *Euglena gracilis* chloroplast // Nature.—1982.—300, N 5887.—P. 78—81.
22. Palmer J. D., Thompson W. F. Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost // Cell.—1982.—29, N 4.—P. 537—550.
23. Teeri T. H., Saura A., Lokki J. Inversion polymorphism in pea chloroplast DNA // Theor. and Appl. Genet.—1985.—69, N 5—6.—P. 567—570.
24. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with physical alterations in their chloroplast DNA // A. M. Myers, D. M. Grant, D. K. Rabert et al. // Plasmid.—1982.—7, N 1.—P. 133—151.
25. Kolodner R., Tewari K. K. Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 1.—P. 41—45.
26. Псарева Е. Н. О роде никоциана // Тр. Всесоюз. ин-та табака и махорки.—1963.—Вып. 153.—С. 10—153.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Получено 10.03.87

УДК 575.24:576.851.5

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФРАГМЕНТА ХРОМОСОМЫ *Bacillus subtilis*, ЧАСТИЧНО СУПРЕССИРУЮЩЕГО МУТАЦИИ В ГЕНАХ *recB recC Escherichia coli*

Ф. Ш. Гизатуллин, Б. И. Барабанщиков

Введение. Мутации в генах *recB recC E. coli* приводят к снижению активности АТФ-зависимой ДНКазы и нарушению процессов репарации и гомологичной рекомбинации [1, 2]. Аналогичные мутации описаны и для *Bac. subtilis* [3, 4], однако с биохимической и генетической точек зрения они изучены менее полно по сравнению с мутациями *E. coli*.

Ранее мы сообщили, что нам удалось клонировать в плазмиде *pBR322* фрагмент хромосомы *Bac. subtilis*, полностью восстанавливающий экзонуклеазную активность АТФ-зависимой ДНКазы клеток *E. coli recB21 recC22*. Присутствие гибридной плазмиды *pKU1* повышало устойчивость мутантных клеток к митомицину, но практически не влияло на частоту рекомбинации при конъюгации [5]. В данной работе приведены результаты по дальнейшей характеристике клонированного фрагмента, установлению его местоположения на хромосоме *Bac. subtilis* и комплементации описанных ранее для данного микроорганизма мутаций *recE5* [3] и *recH342* [4], снижающих активность АТФ-зависимой ДНКазы и нарушающих процессы репарации и рекомбинации.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы *Bac. subtilis 168* (прототроф), *SB-25 (recH342)*, *IA334 (recE5)*, *QB934 (tre glyB argC trpC)*, а также штаммы *E. coli JC5519 (recB21 recC22)*, *JC1583 (recB21 recC22 sbcB)*.

Хромосомную ДНК выделяли по Мармуру [6], плазмидную — щелочным методом [7]. Трансформацию клеток *E. coli* плазмидами проводили по Коэну [8], получение компетентных клеток *Bac. subtilis* — по модифицированному методу Спидайзена [6], трансдукцию фагом *AR9* — по [9].

Активность АТФ-зависимой ДНКазы определяли по [5].

Рестрикцию и лигирование ДНК-электрофорез в 0,8 %-ном агарозном геле, перенос ДНК на нитроцеллюлозные фильтры, блот-гибридизацию осуществляли, как описано в [10].

Результаты и обсуждение. Плазмида *pKU1*, введение которой в клетки мутанта *recB recC E. coli* восстанавливало активность АТФ-зависимой ДНКазы и частично супрессировало мутантный фенотип, содержала фрагмент хромосомы *Bac. subtilis* [5]. На рис. 1 представлены результаты гибридизации по Саузерну ДНК плазмиды *pKU1* и

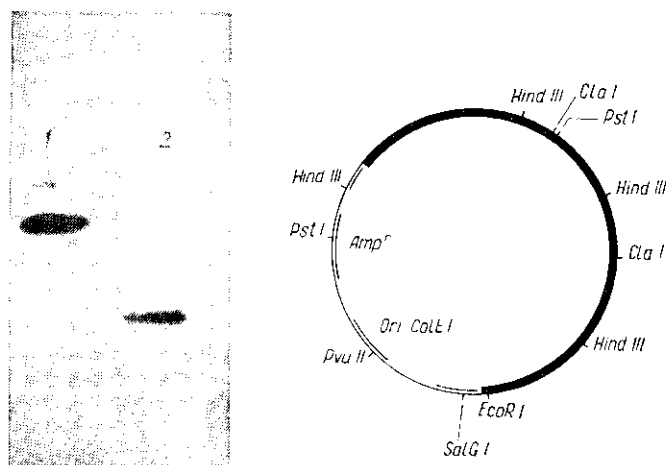


Рис. 1. Радиоавтограф, полученный после гибридизации ^{32}P -меченной плазмиды *pKU1* с ДНК *Bac. subtilis*, расщепленной рестриктазой *SalG1*: 1 — ДНК плазмиды *pKU1*; 2 — ДНК *Bac. subtilis*

Fig. 1. Hybridization of plasmid *pKU1* with *Bac. subtilis* chromosomal DNA: 1 — plasmid *pKU1* digested with *SalG1*, 2 — chromosomal DNA digested with *SalG1*

Рис. 2. Рестрикционная карта плазмиды *pKU1* (закрашен встроенный фрагмент хромосомы *Bac. subtilis*)

Fig. 2. Restriction enzyme map of plasmid *pKU1* (the thick line indicate the chromosomal fragment)

хромосомной ДНК из клеток *Bac. subtilis*, которые четко показывают, что данная плазмида действительно содержит фрагмент хромосомы *Bac. subtilis*.

Рестрикционный анализ плазмиды *pKU1*, результаты которого суммированы на рис. 2, позволил установить, что размер плазмиды составляет 11,3 тысяч пар оснований (т. п. о.), а клонированный в ней фрагмент хромосомы *Bac. subtilis* равен 6,9 т. п. о. и содержит по одному сайту для рестриктаз *EcoRI* и *PstI*, два сайта — *ClaI* и три — *HindIII*. В векторной части плазмиды имеется уникальный сайт для рестриктазы *SalGI*.

Плазмида *pKU1* содержит *ori* плазмиды *ColE1* и поэтому в клетках *Bac. subtilis* не может реплицироваться, что затрудняет ее использование для поиска и комплементации мутантов *Bac. subtilis* со сниженной активностью экзонуклеазы V.

Наличие в плазмиде *pKU1* протяженного района (6,9 т. п. о.), гомологичного хромосомной ДНК, позволило применить ее в качестве интегративного вектора, поскольку было показано, что в клетках *Bac. subtilis* часто происходит встраивание клонированного фрагмента в гомологичный участок хромосомы [11]. Однако использование плазмиды *pKU1* в качестве интегративного вектора осложнилось тем обстоятельством, что находящийся в плазмиде ген устойчивости к ампициллину экспрессировался только в клетках *E. coli* и не проявлялся в клетках *Bac. subtilis* [12]. Это лишало плазмиду удобного селективного маркера, позволяющего следить за передачей клонированного фрагмента хромосомы *Bac. subtilis*. Для устранения данного затруд-

нения было решено встроить в плазмиду *pKU1* ген устойчивости к хлорамфениколу, находящийся в плазмиде *pC194*, который нормально экспрессируется как в клетках *E. coli*, так и в клетках *Bac. subtilis*.

ДНК плазмиды *pC194* обрабатывали рестриктазами *MspI* и *HindIII*. Образующийся в этом случае фрагмент содержит ген устойчивости к хлорамфениколу [13]. Фрагмент был встроен по уникальному сайту *SalGI*, находящемуся в векторной части плазмиды *pKU1* (рис. 2). Полученная в итоге плазида была обозначена нами как

Таблица 1

Влияние плазмиды *pKU10* на экзонуклеазную активность АТФ-зависимой ДНКазы

Influence of plasmid *pKU10* on the exonuclease activity of ATP-dependent deoxyribonuclease

Штамм	Удельная активность фермента	
	в лизатах бесплазмидных клеток	в лизатах клеток, содержащих плазмиду
168 (<i>rec</i> ⁺)	3,81	7,88
SB-25 (<i>recH342</i>)	2,02	4,16
IA334 (<i>recE5</i>)	2,62	4,29

pKU10. Клонирование данной плазмиды вели в клетках эффективно трансформирующегося штамма *JC1583 E. coli*.

Плазида *pKU10*, как и *pKU1*, восстанавливала устойчивость к митомицину мутантных клеток *recB recC* штамма *JC5519 E. coli*. Это показывало, что встраивание гена устойчивости к хлорамфениколу произошло в векторной части плазмиды, и функционирование хромосомных генов *Bac. subtilis* при этом не нарушено.

Плазмиду *pKU10* использовали для комплементации описанных ранее мутаций

recE5 и *recH342 Bac. subtilis* со сниженной активностью АТФ-зависимой ДНКазы [3, 4]. После трансформации мутантных клеток с помощью ДНК плазмиды *pKU10* отбирали клоны, приобретшие устойчивость к хлорамфениколу, и проверяли у них активность фермента. Частота трансформации составляла $1,2 \cdot 10^{-5}$ для мутанта *recE5* и $2 \cdot 10^{-4}$ для *recH342*, что соответствовало частоте хромосомной трансформации у этих штаммов. Это показывает, что в ходе трансформации плазида *pKU10* встраивается внутрь бактериальной хромосомы по району гомологии. Модели, объясняющие механизм интеграции плазмид, содержащих гомологичные хромосоме участки, предполагают дубликацию такого участка с одновременным встраиванием негомологичного района плазмиды [16]. В этом случае можно было ожидать, что встраивание плазмиды *pKU10* приведет к появлению дополнительной копии гена, определяющего экзонуклеазную активность АТФ-зависимой ДНКазы. Действительно, как показывают данные, представленные в табл. 1, введение плазмиды приблизительно в два раза повышает эту активность по сравнению с бесплазмидными штаммами. Активность фермента в мутантных штаммах, содержащих плазмиду, приближалась к таковой бесплазмидных клеток дикого типа, но была приблизительно в два раза ниже по сравнению с теми же клетками, содержащими плазмиду *pKU10*. Это объясняется тем, что мутации *recE5* и *recH342* снижают экзонуклеазную активность фермента. Повышение активности фермента у мутантных штаммов до уровня бесплазмидных клеток дикого типа тем не менее не восстанавливало устойчивости их к митомицину. Следовательно, находящийся на плазмиде *pKU10* ген (или гены) не комплементирует мутации *recE5* и *recH342*.

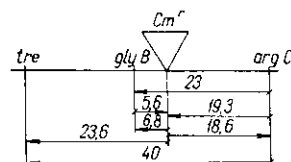
Полученные данные позволяют предположить, что, кроме генов *recE5* и *recH*, структура АТФ-зависимой ДНКазы контролируется еще дополнительным геном, клонированным нами в составе плазмиды *pKU10*. Такое предположение согласуется с данными биохимического анализа, показавшими, что АТФ-зависимая ДНКазы *Bac. subtilis* состоит из пяти субъединиц [15]. Более веские доводы в пользу высказываемого предположения получены после проведения картирования.

Интеграция плазмиды *pKU10* приводит к встраиванию находящегося в ней гена устойчивости к хлорамфениколу, что позволяет кар-

тировать сайт интеграции этой плазмиды в хромосому *Bac. subtilis* и тем самым определить локализацию на генетической карте клонированного гена. С этой целью мы получили препарат трансдуцирующего фага AR9, выращенного на прототрофном штамме 168, содержащем интегрированную плазмиду *pKU10*. В табл. 2 приведены данные по частоте совместной трансдукции гена устойчивости к хлорамфениколу с некоторыми хромосомными маркерами при использовании в качестве реципиента штамма QB934 (*tre glyB argC trpC*). Полученные

Рис. 3. Место интеграции плазмиды *pKU10* в хромосому *Bac. subtilis*

Fig. 3. The site of integration of *pKU10* on the *Bac. subtilis* chromosome



результаты показывают, что сайт интеграции плазмиды *pKU10* находится в районе гена *glyB*, как это показано на рис. 3. Расстояния на генетической карте приведены в виде относительного размера трансдуцирующего фрагмента, вычисляемого на основании данных, представленных в табл. 2.

Таблица 2

Частота котрансдукции маркеров при картировании интегрированной плазмиды *pKU10*
Cotransduction index of the markers on the mapping of integrated plasmid *pKU10*

Селектируемый маркер	Рекомбинантные классы				C	t
	<i>Cm^r</i>	<i>tre</i>	<i>glyB</i>	<i>argC</i>		
<i>Cm^r</i>	+	—	+	—	0,75	6,8
	+	—	—	+	0,50	18,6
	+	+	—	—	0,42	23,6
<i>glyB⁺</i>	+	—	+	—	0,78	5,6
	+	—	+	+	0,43	23,0
	+	—	—	+	0,49	19,3
<i>argC⁺</i>	+	—	—	+	0,23	40,0
	+	+	—	+		

Примечание. Относительное расстояние между генами (*t*) определяли по формуле: $C=1-t/(1+t)$, где *C* — частота котрансдукции маркеров [19].

Результаты генетического анализа показали, что клонированный ген располагается в другом районе хромосомы *Bac. subtilis* по сравнению с мутациями *recE5* и *recH342* и тем самым подтвердили, что нами клонирован новый ген, контролирующий экзонуклеазную активность АТФ-зависимой ДНКазы. Этот ген, расположенный на 75° генетической карты *Bac. subtilis*, мы предлагаем обозначать как *recQ*. По предварительным данным, полученным в лаборатории Венемы, в данном участке хромосомы картированы мутации, снижающие экзонуклеазную активность АТФ-зависимой ДНКазы [16], что хорошо согласуется с нашими данными.

Таким образом, к настоящему времени для *Bac. subtilis* известны три гена, контролирующие структуру АТФ-зависимой ДНКазы: *recE5*, *recH* и *recQ*. Поскольку тщательного биохимического анализа этого фермента не проводили, трудно судить о том, какие субъединицы кодируются тем или иным геном. Можно предположить, что ген *recQ* контролирует структуру экзонуклеазы, входящей в комплекс АТФ-зависимой ДНКазы. Этот ген скорее всего аналогичен гену *recD E. coli*, мутации в котором снижают экзонуклеазную активность АТФ-зависимой ДНКазы, но не влияют на рекомбинационную способность [17]. Гены *recB* и *recD E. coli* образуют один оперон, в котором мутация

recB21, являясь инсерцией, обладает полярным эффектом. Это приводит к уменьшению синтеза продукта гена *recD* и, как следствие, к снижению экзонуклеазной активности фермента [18]. Поскольку продукт гена *recD* не играет существенной роли в рекомбинации [18], повышение экзонуклеазной активности не приводило к восстановлению рекомбинационной способности клеток мутанта *recB21 recC22 E. coli* при введении плазмид *pKU1* и *pKU10* [5]. Это позволяет считать, что плазмиды несут ген *Bac. subtilis*, аналогичный гену *recD E. coli*.

Экзонуклеазная активность АТФ-зависимой ДНКазы *Bac. subtilis* проявляется только в полноценном комплексе, о чем свидетельствует неполное ее восстановление при введении плазмиды *pKU10* в клетки мутантов *recH342* и *recE5* (табл. 1). Для выяснения функционального значения гена *recQ* необходимо изучить соответствующие мутации. Эта работа проводится нами в настоящее время.

Авторы выражают благодарность Ф. К. Хасанову за помощь в выполнении экспериментов по блот-гибридизации.

RESTRICTION ENZYME ANALYSIS AND LOCALIZATION OF *BACILLUS SUBTILIS* CHROMOSOMAL FRAGMENT PARTIALLY SUPPRESSING *recB recC* MUTATIONS OF *ESCHERICHIA COLI*

F. Sh. Gizatullin, B. I. Barabanschikov

V. I. Ulyanov-Lenin State University, Kazan, USSR

Summary

The original plasmid *pKU1* partially suppressing *recB21 recC22* mutations of *E. coli* contains a 6.9 kb chromosomal fragment of *Bac. subtilis*. Using this plasmid an integrative vector for *Bac. subtilis* was constructed. The complementation analysis revealed that the cloned fragment contained a new *Bac. subtilis* gene, which codes the exonuclease activity of ATP-dependent DNase and differs from *recE5* and *recH* genes. The new gene, designated as *recQ*, has been located in *glyB* region on 75° of the *Bac. subtilis* genetic map.

1. Barbour S., Clark A. Biochemical and genetic studies of recombination proficiency in *E. coli*. Enzymatic activity associated with *recB*⁺ and *recC*⁺ genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1970.—65, N 4.— P. 955—961.
2. Clark A. Recombination deficient mutants of *E. coli* and other bacteria // Annu. Rev. Genet.— 1973.—7.— P. 67—86.
3. Doly J., Saserman E., Anagnostopoulos C. ATP-dependent deoxyribonuclease in *Bac. subtilis* and a mutant deficient in this activity // Mutat. Res.— 1974.—22, N 1.— P. 15—23.
4. Мутант *Bac. subtilis* с нарушенной способностью к рекомбинации и сниженной активностью АТФ-зависимой дезоксирибонуклеазы / А. А. Прозоров, Н. А. Калинина, Л. С. Наумов и др. // Генетика.— 1972.—8, № 12.— С. 142—148.
5. Частичная супрессия мутаций *recB, recC E. coli* плазмидой *pBR322*, содержащей вставку хромосомы *Bac. subtilis* / Б. И. Барабанщиков, В. И. Башкиров, Ф. Ш. Гизатуллин, В. Ш. Гулиташвили // Цитология и генетика.— 1985.—19, № 2.— С. 128—132.
6. Прозоров А. А. Генетическая трансформация и трансфекция.— М.: Наука, 1980.— 248 с.
7. Birnboim H. C., Doly J. C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.—7, N 6.— P. 1513—1523.
8. Cohen S. N., Chang A. C., Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1972.—69, N 6.— P. 2110—2114.
9. Азизбекян Р. Р., Кривиский А. С. Система фаг — клетка *Bac. subtilis* как объект для изучения генетики микроорганизмов // Генетика.— 1966.—2, № 5.— С. 111—116.
10. Маннатиц Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—480 с.
11. Prozorov A. A., Sauchenko G. V., Lakotova N. M. Insertion of foreign functioning DNA into *Bac. subtilis* chromosome // Gene.— 1983.—22, N 1.— P. 41—46.
12. Лидеман Л. Д. Факторы, ограничивающие экспрессию генов *E. coli* в клетках бацилл // Генетика.— 1983.—19, № 5.— С. 693—707.

13. Horinouchi S., Weisblum B. Nucleotide sequence and functional map of *pC194*, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance // *J. Bacteriol.*—1982.—150, N 3.—P. 814—825.
14. Башкиров В. И. Пути интеграции чужеродной ДНК в хромосому бактерий // Основ. направления генетики микроорганизмов.—М.: Наука, 1985.—С. 70—78.
15. Doly J., Anagnostopoulos C. Isolation, subunit structure and properties of the ATP-dependent deoxyribonuclease of *Bac. subtilis* // *Eur. J. Biochem.*—1976.—77, N 1.—P. 309—316.
16. Kooistra J., Venema G. Partial cloning of *Bac. subtilis* genes involved in the synthesis of the ATP-dependent DNase // Genetic exchange. The 8th Eur. meet. on genet. transformation: Abstr.—Uppsala, 1986.—P. 63.
17. Chaudhury A., Smith G. A new class of *E. coli* *rec BC* mutants: implication for the role of *rec BC* enzyme in homologous recombination // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 24.—P. 7850—7854.
18. *Rec D*: the gene for an essential third subunit of exonuclease V / S. Amundsen, A. Taylor, A. Chaudhury, G. Smith // *Ibid.*—1986.—83, N 15.—P. 5558—5562.
19. Henner D., Hoch J. The genetics map of *Bac. subtilis* // *Mol. biol. of the Bacilli.*—New York: Acad. press, 1982.—P. 1—33.

Казан. гос. ун-т им. В. И. Ульянова-Ленина

Получено 14.04.87