

УДК 576.851.132

А. А. СЕЧЕНИКОВ, М. А. ТИТОК

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ *rep*-ОБЛАСТИ ПЛАЗМИДЫ pBS267 ГРУППЫ IncP-9, ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕЙ ДЕГРАДАЦИЮ КАПРОЛАКТАМА

(Представлено членом-корреспондентом О. Г. Давыденко)

Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 16.02.2011

Введение. Плазмиды группы IncP-9 бактерий *Pseudomonas* представляют собой разнообразную группу внехромосомных генетических элементов, обеспечивающих содержащим их микроорганизмам устойчивость к антибиотикам, ультрафиолетовому облучению, а также деградацию целого ряда природных и синтетических субстратов [1]. Способные передаваться широкому кругу грамотрицательных бактерий, они характеризуются рядом отличительных особенностей. В частности, в гетерологичных бактериях *E. coli*, базовый репликон, содержащий *rep*-ген и *oriV*-сайт, не копируется и плазмиды утрачиваются при оптимальной для роста данных микроорганизмов температуре (выше 36 °С) [2]. Изучение систем репликации плазмид группы IncP-9 позволит понять механизмы, ограничивающие круг их потенциальных хозяев в природной среде обитания, а также обеспечит возможность их использования для различного рода генно-инженерных манипуляций с целью создания конкурентоспособных штаммов-деструкторов органических соединений и универсальных систем для молекулярного клонирования.

Цель работы – клонирование и функциональный анализ *rep*-области плазмиды pBS267 группы IncP-9 бактерий *Pseudomonas*, детерминирующей деградацию капролактама.

Материалы и методы исследования. В работе использовали коллекционные штаммы бактерий *Pseudomonas* (*P. putida* КТ2442, *P. putida* М, *P. mendocina* 940, *P. mendocina* В972, *P. aeruginosa* ML4600, *P. stutzeri* В975, *P. chlororaphis* В1246, *P. chlororaphis* В1391, *P. marginata* ТВ, *P. aureofaciens* В1393, *P. pseudoalcaligenes* В1295, *P. caryophylli* В1296, *P. fluorescens* В894, *P. pal-leroni* В1328, *P. auraniaca* В14) и *E. coli* (*E. coli* BW 19851, *E. coli* DH5α), а также плазмиды pBS267, pGEM-T Easy, pK18mob и pUC4K из коллекции НИЛ молекулярной генетики бактерий.

Среды. Бактерии выращивали в полноценной среде LB и минимальной среде M9 [3]. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара, источником углерода служила глюкоза в концентрации 0,2 %. В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков рифампицина, канамицина и ампициллина в концентрации 50 мкг/мл. Изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG) и β-галактозидазу (X-Gal) производства MBI Fermentas (Литва) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя и использовали в концентрации 0,5 мМ и 50 мкг/мл соответственно.

Выделение тотальной ДНК осуществляли с использованием саркозилового метода [4].

Плазмидную ДНК из бактерий выделяли методом щелочного лизиса [5].

Трансформацию бактерий *E. coli* и *P. putida* КТ2442, предварительно переведенных в состояние компетентности, проводили согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве [6].

Скрещивание бактерий. Клетки донорных и реципиентных бактерий, находящиеся в логарифмической фазе роста, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в физиологическом растворе для получения бактериальных взвесей, содержащих $1-9 \cdot 10^8$ и $1-9 \cdot 10^{10}$ кл/мл соответственно. Затем культуры смешивали в соотношении 1 : 1 и смесь наносили на стерильные мембранные фильтры («Сынпор» с диаметром пор, равным 0,23 мкм), помещенные на поверхность полноценной агаризованной среды в чашках Петри. Скрещиваемые бактерии инкуби-

ровали в течении 3–18 ч при 28 °С. Частоту переноса маркеров выражали отношением числа формирующихся трансконъюгантов к общему числу клеток донора.

Манипуляции с плазмидами. Рестрикцию плазмидной ДНК, обработку фрагментом Кленова, лигирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой изготовителем Fermentas (Литва). Фрагменты ДНК после рестрикции и продукты амплификации элюировали из агарозного геля с использованием набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва). Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в [6]. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ DNA Ladder Mix производства «Fermentas» (Литва).

Химический мутагенез in vitro. Плазмидную ДНК обрабатывали раствором гидроксиламина (0,8 М гидроксиламина в 0,1 М фосфатного буфере, содержащем 1 мМ EDTA, pH 6,0; в расчёте 200 мкл раствора на 150 нг ДНК). Раствор выдерживали на водяной бане при 70 °С. Через каждые 5 мин производили отбор проб объемом 20 мкл; пробы разводили в ТЕ буфере (в соотношении 1 : 6) и ДНК переосаждали изопропанолом. Обработанную ДНК использовали для трансформации бактерий.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора реактивов TaKaRa Ex Taq™ (Япония). *Rep*-область плазмиды pBS267 размером 1308 п. н. амплифицировали с помощью праймеров *Rep-ori-SalI* (5'-ACG CGT CGA CAA CGT GAT GCG TAA TCG TG -3') и *Rep-ori-SalI*: (5'-ACGCGTTCGACCCTCAGTTACCGTGGG-3') при режиме амплификации: 94 °С – 5 мин (1 цикл); 94 °С – 30 сек, 50 °С – 30 сек, 68 °С – 1,5 мин (30 циклов); 68 °С – 10 мин (1 цикл).

Сиквенс-анализ. Выделение ДНК для сиквенса осуществляли с помощью GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва). Секвенирующую реакцию осуществляли с использованием реактивов CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit производства Fermentas, Литва. Для секвенирующей реакции использовали праймеры: F267 5'-[Cy5]GAT AAC GTG CAA GGA TGC-3', pK18-F 5'-[Cy5]GCG GAA GAG CGC CC-3', pK18-R 5'-[Cy5]GCC TGG GGT GCC TAA T-3'.

Сиквенс осуществляли с помощью автоматического секвенатора (ALFexpress II). Результаты анализировали с использованием компьютерных программ BLASTP2.2.1 (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ALFwin™ Sequence Analyser (version 2.10).

Определение числа плазмидных копий. Число копий плазмиды pKMmob, pKMmob-7, pKMmob-10, pKMmob-12 определяли в клетках *P. putida* KT2442 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием системы Chromo4™ (США). Для ПЦР-реакции использовали праймеры, обеспечивающие амплификацию *rep*-гена плазмиды pBS267 размером 128 п. н. (FSYB267 GAC ACC TCG GTC GCC ACC AC и RSYB267 CCA TGC GAT ACG GCT ATT CAC CAC) и последовательность уникального хромосомального гена *recA* размером 143 п. н. (FrecA CCG TTC CGT CAG GCT GAG TTC C и RrecA GCC TTG ACC GAT CTT GTT GCC TTG). Реакционная смесь (30 мкл) содержала буфер (1x NH₄Cl), MgCl₂ (1,5 мМ/л), Taq-полимеразу (0,75 ед), праймеры (3 пМ/мкл), ZUBR Green-1 (0,8x) производства «Праймтех» (Беларусь, Минск). Матрицу использовали в концентрации 1–10 нг.

Стабильность наследования плазмид проверялась путем культивирования плазмидсодержащих бактерий (исходное количество которых составляло 10³ кл/мл) в неселективных условиях до стационарной фазы роста с последующим высевом на полноценный агар и на полноценный агар с добавлением канамицина в концентрации 50 мкг/мл.

Результаты и их обсуждение. Плазмиды группы IncP-9 характеризуются не только разнообразием фенотипических признаков, но и полиморфной организацией *rep*-областей. В настоящее время описано 8 подгрупп плазмид IncP-9 (α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -, η -, θ - и ι -подгруппы), отличающихся последовательностями *rep*-генов и *oriV*-сайтов на 7–35 % [7]. Определена полная нуклеотидная последовательность плазмид α - (pMT2), β - (pWWO), δ - (pDTG1) и ζ -подгрупп (NAH7) [8–11]. Имеющиеся данные создают предпосылки для изучения систем репликации данной уникальной группы внехромосомных генетических элементов. Определенный интерес представляют плазмиды γ -подгруппы, детерминирующие деградацию капролактама. В отличие от других представителей группы IncP-9, они способны стабильно поддерживаться в клет-

ках *E. coli* при температуре 36 °C [12], что свидетельствует о функциональных особенностях их систем репликации.

Одним из подходов в изучении репликативных функций крупных плазмид (размер плазмиды pBS267 составляет 150 kb [13]) является минимизация их геномов с последующим анализом изолированных *rep*-областей. Для конструирования мини-репликонов можно использовать два подхода. Первый заключается в объединении фрагментов плазмидной ДНК, ответственных за репликацию, с маркером антибиотикорезистентности. Второй предполагает конструирование плазмид, содержащих два репликона, один из которых (ColE1-репликон) обеспечивает наследование только в клетках *E. coli*, а второй (репликон плазмиды pBS267) – в системе бактерий *Pseudomonas*. Такие бирепликонные конструкции весьма удобны, поскольку позволяют вносить различного рода изменения в исследуемую последовательность (в том числе летальные мутации). При этом все манипуляции с плазмидной ДНК можно осуществлять в клетках *E. coli* (в частности, выделять плазмидную ДНК в высокой концентрации, осуществлять секвенс-анализ), а функциональный анализ проводить как в гомо- (в бактериях *Pseudomonas*), так и гетерологичной системах (в бактериях *E. coli*, мутантных по ДНК-полимеразе I, в клетках которых не копируется ColE1-репликон).

Наличие полной нуклеотидной последовательности плазмиды pMT2 (α -подгруппа IncP-9) позволило сконструировать праймеры, обеспечивающие амплификацию *rep*-области плазмиды pBS267. Присутствие сайтов узнавания для рестриктазы Sall на 5'-концах используемых праймеров обеспечило последующие манипуляции с полученным продуктом амплификации. На первом этапе ампликон был встроен в состав вектора pGEM-T Easy с последующим вырезанием клонированной последовательности по Sall-сайтам и легированием с геном канамицинрезистентности (вырезан по Sall-сайтам из вектора pUC4K). Легированной смесью трансформировали клетки *P. putida* KT2442 и *E. coli* DH5 α . В результате этих экспериментов были получены трансформанты только в бактериях *Pseudomonas*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что мини-репликон плазмиды pBS267, содержащий *rep*-ген и *oriV*-сайт, не способен копироваться в клетках *E. coli* и в этом плане система репликации данной плазмиды не отличается от таковой плазмиды pMT2 α -подгруппы группы IncP-9, наследование которой в гетерологичной системе требует дополнительного присутствия *par*-локуса [14]. Клонированный вышеуказанным способом мини-репликон характеризовался низкой копийностью, в связи с чем последующие манипуляции с гибридной молекулой представляли определенные технические затруднения (в частности, требовались дополнительные затраты при выделении ДНК в препаративных количествах), а также осложнялся процесс получения и анализа мутантных вариантов. В связи с этим было осуществлено встраивание *rep*-области плазмиды pBS267 в состав вектора pK18mob. Для этого исследуемую *rep*-область вырезали из вектора pGEM-T Easy по сайтам Sall, обрабатывали фрагментом Кленова и встраивали в незначимую область вектора pK18mob (между сайтами VspI, обработанными ферментом Кленова). В результате была получена гибридная плаزمиды pKMmob искомого размера (4822 п. н.), содержащая два репликона (ColE1 и pBS267), полилинкер в составе *lacZ* гена (с уникальными сайтами для рестриктаз EcoRI, ApoI, KpnI, Acc65I, XbaI, Sall, HincII, AccI, BspMI, SphI, HindIII), маркер канамицинрезистентности и способная передаваться путем конъюгации из клеток *E. coli*, в хромосоме которых присутствовали *tra*-гены плазмиды широкого круга хозяев RP4 (мобилизующий штамм *E. coli* BW19851).

Для анализа репликативных функций мини-репликона плазмиды pBS267 был изучен характер наследования полученной конструкции pKMmob в бактериях *Pseudomonas*. В клетки исследуемых микроорганизмов плазмиды передавалась путем конъюгации из штамма *E. coli* BW19851. В результате проведенных экспериментов установлено, что в отличие от исходной капролактомамовой плазмиды pBS267 [12] плазмиды pKMmob не стабильно поддерживается в клетках псевдомонад, утрачиваясь с частотой до 99,98 % (из бактерий *P. stutzeri* B975). Наиболее стабильно плазмиды поддерживалась в бактериях *P. putida* KT2442, элиминируясь из клеток с частотой 94 %. Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что функция наследования данной плазмиды не обеспечивается *rep*-геном и *oriV*-сайтом, а требует присутствия дополнительных функциональных единиц, например *par*-локуса (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Анализ наследования плазмиды рКМmob в бактериях рода *Pseudomonas*

Бактерия-реципиент	Частота конъюгационного переноса плазмиды рКМmob	Стабильность наследования плазмиды рКМmob, %
<i>P. putida</i> КТ2442	$7,7 \cdot 10^{-2}$	6
<i>P. putida</i> М	$9,2 \cdot 10^{-2}$	2
<i>P. mendocina</i> 940	$4,9 \cdot 10^{-4}$	0,12
<i>P. mendocina</i> В972	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,03
<i>P. aeruginosa</i> ML4600	$5,7 \cdot 10^{-6}$	0,15
<i>P. stutzeri</i> В975	$1,4 \cdot 10^{-2}$	0,02
<i>P. chlororaphis</i> В1246	$2,6 \cdot 10^{-2}$	1
<i>P. chlororaphis</i> В1391	$5,4 \cdot 10^{-5}$	3
<i>P. marginata</i> trpВ1	$1,4 \cdot 10^{-2}$	0,7
<i>P. aureofaciens</i>	$1,4 \cdot 10^{-1}$	2
<i>P. pseudoalcaligenes</i> В1295	$3,7 \cdot 10^{-1}$	0,5
<i>P. caryophylli</i> В1296	$1,8 \cdot 10^{-1}$	3
<i>P. fluorescens</i> В894	$2,1 \cdot 10^{-1}$	1
<i>P. palleroni</i> В1328	$1,5 \cdot 10^{-2}$	0,3
<i>P. aurantiaca</i> В14	$1,6 \cdot 10^{-2}$	4

Известно, что для многокопийных плазмид (в составе их генома отсутствует *par*-локус) характерно случайное распределение между дочерними клетками в процессе деления и, как следствие, высокая стабильность наследования в ряду поколений. Следует отметить, что наличие большого числа копий в клетке может являться исходным свойством плазмидных репликонов (так называемые плазмиды с ослабленным контролем репликации), либо повышаться искусственным путем (в результате мутагенеза) за счет нарушений в области *oriV*-сайта либо *rep*-гена [15]. Исходя из этого, была предпринята попытка получения вариантов плазмиды рКМmob, стабильно наследующихся в бактериях *Pseudomonas*. Для этого плазмидную ДНК подвергали обработке гидроксиламином (обрабатывали 0,8 М раствором гидроксиламина при температуре 70 °С в течение 20–45 мин), осаждали и трансформировали бактерии *P. marginata* trpВ1. Отбор трансформантов осуществляли на среде с канамицином в концентрации 1500 мкг/мл (бактерии *P. marginata* trpВ1, содержащие исходную плазмиду рКМmob, способны расти в присутствии не более 250 мкг/мл канамицина). Предполагалось, что клетки, способные расти в присутствии высоких концентраций антибиотика, восприняли варианты плазмиды с измененным числом копий. Известно, что уровень экспрессии гена (в данном случае гена канамицинрезистентности) может повышаться с увеличением числа его копий (число копий гена увеличивается за счет увеличения числа копий плазмид). В результате отобрано около 20 трансформантов, из клеток которых были выделены плазмиды, три из которых использованы для дальнейшего анализа (обозначены как рКМmob-7, рКМmob-10, рКМmob-12). Изучена стабильность их наследования в клетках бактерий *Pseudomonas*, определена полная нуклеотидная последовательность *rep*-гена и *oriV*-сайта репликона рBS267, исследована копияность в бактериях *P. putida* КТ2442. В качестве контроля использовали исходную плазмиду рКМmob. В результате установлено, что отобранные варианты характеризуются увеличением стабильности наследования. Причем наиболее стабильно наследовалась плазмида рКМmob-12 (в частности, в бактериях *P. stutzeri* В975 и *P. pseudoalcaligenes* В1295 стабильность наследования составляла 100 %) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Анализ наследования вариантов плазмиды рКМmob в бактериях *Pseudomonas*

Бактерия-хозяин	Стабильность наследования плазмиды, %			
	рКМmob	рКМmob-7	рКМmob-10	рКМmob-12
<i>P. putida</i> КТ2442	6	42	62	93
<i>P. stutzeri</i> В975	0,02	43,3	80,5	100
<i>P. chlororaphis</i> В1246	1	63,3	80	97
<i>P. pseudoalcaligenes</i> В1295	0,5	33,3	50	100
<i>P. palleroni</i> В1328	0,3	34,6	68,5	93

Анализ секвенированных последовательностей позволил выявить следующие изменения нуклеотидного состава в мутантных вариантах плазмиды рКМmob. Для варианта рКМmob-7 были выявлены две транзиции (замена гуанина на аденин, G→A) в позиции 451 и 637 нуклеотидов. Первая замена в позиции 451 нуклеотида затрагивала область *oriV*, тогда как вторая мутация локализовалась в пределах *rep*-гена и обеспечивала замену 39 аминокислоты аланина на треонин. Представлялось важным установить в каких областях (вариабельных или консервативных) происходят выявленные изменения. Для этого проведен сравнительный анализ последовательностей *rep*-генов и *oriV*-сайтов плазмид группы IncP-9 (использованы данные Gene bank) [7]. Сравнительный анализ последовательностей *rep*-генов плазмид группы IncP-9 (α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -, η - и θ -подгрупп) позволил установить, что у плазмид всех подгрупп 39 аминокислота представлена аланином и, следовательно, ее замена может повлиять на изменение свойств белковой молекулы. Анализ последовательностей *oriV*-сайтов плазмид группы IncP-9 позволил установить, что 451 нуклеотид в последовательности плазмиды рBS267 является уникальным и отличается от других представителей данной группы (данный нуклеотид у других представителей представлен пиримидином, а именно тиминном или цитозинном). Следует отметить, что для плазмиды рMT2 (α -подгруппа) установлено, что именно эта позиция (представлена тиминном) является стартом для работы РНК-полимеразы, обеспечивающей транскрипцию *rep*-гена [14].

Таким образом, анализ нуклеотидной последовательности мутантного варианта рКМmob-7 позволил выявить два мутационных изменения, каждый из которых может влиять на функцию наследования данной плазмиды. Однако следует отметить, что мутантный вариант рКМmob-7 характеризовался наименьшей стабильностью относительно других мутантных плазмид. Появление двух изменений одновременно в пределах одной последовательности, видимо, может играть различную роль в функции стабильного поддержания плазмидного репликаона в бактериальной клетке.

Для варианта рКМmob-10 были выявлены четыре транзиции (замена гуанина на аденин, G→A) в позициях 443, 445, 449 и 489 нуклеотидов. Все замены локализовались в пределах *oriV*-сайта. Замены в позициях 443, 445 и 449 нуклеотидов локализовались в участке, характеризующемся полиморфизмом, причем замены 443 и 445 нуклеотидов приводили к образованию последовательностей, характерных для нативных плазмид δ -, η - и θ -подгрупп. Этот факт может свидетельствовать в пользу того, что данные изменения не являются значимыми и не должны влиять на функцию наследования плазмиды рКМmob-10. Изменения 445 нуклеотида приводили к образованию последовательности ТАТА. Если учитывать тот факт, что для плазмиды рMT2 (α -подгруппа) этот участок идентифицирован как область «-10» промотора *rep*-гена [14], данная замена обеспечила образование канонической последовательности «-10» и, следовательно, могла влиять на функцию наследования исследованного мутантного варианта. Транзиция, затрагивающая 489 нуклеотид, также могла иметь функциональное значение, поскольку для плазмиды рMT2 (α -подгруппа) показано, что данная область является местом связывания с белком инициации репликации. Следует отметить, что данная область достаточно консервативна и характеризуется сходством нуклеотидного состава для плазмид всех подгрупп IncP-9.

Наибольший интерес представлял анализ нуклеотидной последовательности плазмиды рКМmob-12, которая наиболее стабильно наследовалась в клетках бактерий *Pseudomonas* (табл. 2). В результате сиквенса-анализа плазмиды рКМmob-12 было идентифицировано единственное изменение (замена гуанина на аденин, G→A) в пределах *rep*-гена, приводящее к замене 127 аминокислоты (аланина на треонин). Сравнительный анализ последовательностей *rep*-генов плазмид группы IncP-9 показал, что данная последовательность сходна для плазмид различных подгрупп и во всех случаях 127 аминокислота представлена аланином. Следовательно, ее замена должна иметь важное функциональное значение.

На последнем этапе определялось число копий исходной и мутантных вариантов плазмиды рКМmob в клетках *P. putida* КТ2442. Для этого из плазмидсодержащих бактерий, выращенных до стационарной фазы роста (с выравненными значениями оптической плотности), была выделена тотальная ДНК, которую добавляли в качестве матрицы в полимеразную цепную реакцию (1–10 нг). При этом использовали два типа праймеров, обеспечивающих соответственно ампли-

фикацию последовательности *rep*-гена плазмиды pBS267 размером 128 п. н. и последовательность гена *recA* размером 143 п. н., представленного в хромосоме бактерий *P. putida* KT2442 одной копией. Убедившись в возможности амплификации указанных выше детерминант в полимеразной цепной реакции, были поставлены эксперименты с добавлением интеркалирующего флюоресцентного красителя ZUBR Green-1 (аналог SYBR Green I) для определения числа плазмидных копий с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. Анализ уровня флюоресценции при встраивании красителя в продукты генов *rep*- и *recA* в пороговом цикле амплификации позволил установить, что плазмиды характеризуются разным числом копий, а именно число копий плазмиды pKMmob составляет 1,62; плазмиды pKMmob-7 – 6,3; плазмиды pKMmob-10 – 7,7; плазмиды pKMmob-12 – 9,2 (приведены средние значения трех независимых экспериментов).

Заключение. Таким образом, в ходе выполнения работы впервые получен и исследован мини-репликон плазмиды pBS267 группы IncP-9 (γ -подгруппа), детерминирующей деградацию капролактама. Впервые изучен круг потенциальных бактериальных хозяев данного внехромосомного генетического элемента. Установлено, что в клетках бактерий *Pseudomonas* базовый репликон плазмиды pBS267 (содержит *rep*-ген и *oriV*-сайт) наследуется нестабильно. Повышение стабильности связано с изменением числа плазмидных копий в клетке, которое в свою очередь обеспечивается мутациями в области *rep*-гена и *oriV*-сайта. Полученные конструкции могут служить основой для дальнейшего изучения механизмов репликации плазмид группы IncP-9, а также являются хорошим исходным материалом для конструирования векторов для молекулярного клонирования в широком круге грамотрицательных бактерий.

Литература

1. Jacoby G. A., Shapiro J. A. // DNA Insertion Element plasmids and Episomes / Eds. A. J. Burchary, J. A. Shapiro, S. Adhya. Cold Spring Harbor Lab., 1977. P. 635–655.
2. Титок М. А., Лысак В. В., Кульба А. М. // Вестн. БГУ. 1989. Сер. 2, № 2. С. 42–46.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976. – 436 с.
4. Riele H., Michel B., Ehrlich S. D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83, № 8. P. 2541–2545.
5. Birnboim H. L., Doly J. // Nucl. Acids. Res. 1979. Vol. 7, № 6. P. 1513–1523.
6. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. NY., 1989. – 468 p.
7. Sevastyanovich Y. R., Krasowiak R., Bingle L. E. et al. // Microbiology. 2008. Vol. 154. P. 2929–2941.
8. Greated A., Titok M., Krasowiak R. et al. // Microbiology. 2000. Vol. 146. P. 2249–2258.
9. Greated A., Lamberts L., Williams P. A., Thomas C. M. // Environ. Microbiol. 2002. Vol. 4, № 12. P. 856–871.
10. Dennis J. J., Zylstra G. J. // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 341. P. 763–768.
11. Sota M., Yano H., Ono A. et al. // J. Bacteriol. 2006. Vol. 188, № 11. P. 4057–4067.
12. Василенко С. Л., Титок М. А. // Микробиология. 2008. Т. 77, № 1. С. 16–22.
13. Есикова Т. З., Грищенко В. Л. А., Кулаков М. А. и др. // Мол. генет., микробиол., вирусол. 1990. № 4. С. 25–28.
14. Sevastyanovich Y. R., Titok M. A., Krasowiak R. et al. // Molecular Microbiology. 2005. Vol. 57, № 3. P. 819–833.
15. Espinosa M., Cohen S., Couturier M. et al. // The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread / Ed. C. M. Thomas. Amsterdam, 2000. P. 1–47.

SECHENIKOV A. A., TITOK M. A.

titok@bsu.by

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *rep*-REGION OF IncP-9 PLASMID pBS267 CONTROLLING CAPROLACTAM DEGRADATION

Summary

The mini-replicon of IncP-9 group plasmid pBS267 (γ -subgroup) controlling caprolactam degradation has been cloned for the first time. It has been determined that minimal replicon containing *rep*-gene and *oriV*-site was characterized by the instability of inheritance in bacteria *Pseudomonas* (in 12 species of *Pseudomonas* were investigated). Using mutagenesis *in vitro* the variants of mini-replicon, whose stability of inheritance in bacteria *Pseudomonas* was increased up to 100%, have been obtained. The sequences analysis of mutant plasmids has allowed detecting transitions (substitutions of guanine for adenine) in *rep*-gene and *oriV*-site region. It has been determined that the mutant variants have been characterized by increase of copy numbers in the cells of bacteria *P. putida*. The obtained results can serve as a basis for studying the replication mechanism of IncP-9 plasmids, and the obtained constructions can be used for creating vector systems for molecular cloning in a broad range of gram-negative bacteria.