

## ПЛАЗМИДЫ ГРУППЫ INCР-9 КАК ОСНОВА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ

**А.А. СЕЧЕНИКОВ, М.А. ТИТОК**

It has been selected mutant variants by using mutagenesis *in vitro* which are characterized by an increase of copy number in the cell, ability to replicate in bacteria *E. coli* and relatively stable inherited in bacteria *P. putida*. The received constructions are a basis for studying of replication mechanisms of IncP-9 plasmid and also can be used as the vector systems for molecular cloning in the broad range of gram-negative bacteria

Ключевые слова: плазмиды, IncP-9, *Pseudomonas putida*, *E. coli*

Разнообразные системы метаболизма, обеспечивающие бактериям способность размножаться в экстремальных условиях внешней среды, во многом, обусловлены наличием в их клетках внехромосомных генетических элементов. Особый интерес представляют плазмиды группы IncP-9, детерминирующие устойчивость к антибиотикам [1], ультрафиолетовому излучению [2], а также способность утилизировать широкий спектр органических соединений [3]. Знание генетической организации и особенностей наследования плазмид данной группы может служить основой для понимания процессов, обеспечивающих адаптационные изменения в природных бактериальных популяциях, а также использоваться для решения экологических и биотехнологических задач.

Целью настоящей работы явилось изучение генетической организации гер-области природной плазмиды группы IncP-9, которая обеспечивает деградацию капролактама (pBS267).

Плазмида рBS267 характеризуются некоторыми особенностями. В отличие от других представителей группы IncP-9, плазмида рBS267, принадлежащая к  $\gamma$ -подгруппе, способна поддерживаться в гетерологичных бактериях (*E. coli*) и ее наследование не зависит от температурного фактора [4].

Клонирован и секвенирован мини-репликон Car-плазмиды рBS267. Показано, что мини-репликон (содержит *oriV*-сайт и *rep*-ген) не может наследоваться в бактериях *E. coli* и стабильно поддерживаться в клетках *Pseudomonas* (утрачиваются с частотой до 99,9 %). В результате мутагенеза *in vitro* (обработка гидроксилмином) были получены мутантные варианты мини-репликона плазмиды рBS267, стабильность наследования которых в клетках бактерий *Pseudomonas* составила 80% - 100 %. Один из мутантных вариантов, обозначенный как рKM18mob-12 характеризовался не только стабильностью наследования, но увеличением числа копий в клетках *Pseudomonas* практически в 10 раз (копийность определялась с использованием метода ПЦР в реальном времени). В последовательности Rep-белка данного варианта была идентифицирована замена 127 аминокислоты аланина на треонин.

Полученные мини-репликоны могут служить основой для изучения тонких механизмов репликации плазмид группы IncP-9, а так же для создания векторных систем для молекулярного клонирования в бактериях рода *Pseudomonas*.

#### Литература

1. Желдакова Р.А., Максимова Н.П., Кульба А.М., Фомичев Ю.К. Конъюгативная R-плазмида факультативных метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. М. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1985. – № 1. – С. 26–30.
2. Jacoby G.A. Plasmid determined resistance to carbenicillin and gentamycin in *Pseudomonas aeruginosa* // Plasmids and Transposons / Eds. – 1980. – P. 83–96.
3. Боронин А.М., Цой Т.В. Генетические системы биodeградации: организация и регуляция экспрессии // Генетика. – 1989. – № 4. – С. 581–594.
4. S. L. Vasylenko and M. A. Titok Inheritance of Biodegradation Plasmids in the Cells of Homo- and Heterologous Hosts // Microbiology. – 2008. – Vol. 77, №1. – P. 16–22.