

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К КАНАМИЦИНУ

Д.С. Набережнов, канд. биол. наук

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российской академии наук (Россия, г. Москва)

DOI:10.24412/2500-1000-2022-11-1-20-24

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-34-60031.*

**Аннотация.** Молекулярное клонирование ДНК широко используется в исследовательской практике и биотехнологии для получения плазмидных и вирусных векторов. Методы молекулярного клонирования не требуют сложного технического оборудования, но имеют множество технических трудностей. Одной из таких трудностей является молекулярное клонирование, в котором используются белки, которые оказывают влияние на жизнедеятельность трансформированных бактериальных клеток. Мы сообщаем об оптимизации методики молекулярного клонирования с использованием канамицина при его использовании в качестве антибиотика для селекции трансформированных клеток.

**Ключевые слова:** молекулярное клонирование, канамицин, устранение трудностей молекулярного клонирования, резистентность к антимикробным препаратам.

Клонирование генов – процесс создания копий определенного гена с использованием методов молекулярной биологии. Молекулярное клонирование – процесс извлечение последовательности ДНК или гена из одного источника и введение в вектор (плазмиду). После проведения данной процедуры полученный вектор можно использовать для создания множества копий ДНК, экспрессии белка, а также для модификации последовательности для изменения функций белка. Начало развитию методов молекулярного клонирования послужило открытие в 70-х годах XX века эндонуклеаз рестрикции и лигазы [1-4], а затем получили дальнейшее развитие с развитием методов ПЦР и сайт-направленного мутагенеза, позволяющих изменять последовательность генов ДНК.

Молекулярное клонирование ДНК с помощью классического подхода, основанного на рестрикции и лигировании, неизменно включает в себя четыре основных этапа: рестрикцию ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование фрагментов ДНК с вектором, трансформацию в компетентные клетки и скрининг колоний. Тем не менее, существуют несколько альтернативных способов, которые могут

быть применены в зависимости от конкретных целей. В XXI веке появилось много новых методов клонирования, таких как Gateway, сборка по Гибсону, Golden Gate, беспроводное клонирование и другие [5-10]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки, а также свою область применения. Кроме того, следует отметить, что все методы молекулярного клонирования считаются относительно сложными биотехнологическими методами, имеющими множество особенностей проведения процедуры.

Тем не менее, вне зависимости от метода молекулярного клонирования конечным продуктом является бактерия, содержащая полученную в результате проведения процедуры плазмиду. Необходимыми элементами плазмиды являются последовательность начала репликации необходимая для деления плазмиды и ген, кодирующий белок устойчивости к антибиотику, требующийся для селекции бактерий, содержащих плазмиду. Наиболее часто используемым антибиотиком для селекции является ампициллин, но также используются и другие антибиотики, такие как канамицин [11].

Устойчивость бактерий к канамицину

кодирует аминогликозид-3'-фосфотрансфераза – фермент, катализирующий фосфорилирование аминогликозидов [12]. Аминогликозиды – соединения, образующие связь с бактериальными рибосомами, тем самым нарушая биосинтез белка и вызывая гибель бактериальной клетки. Фосфорилирование аминогликозида, такого как канамицин, приводит к нарушению его связывания с рибосомой и деактивированию антибиотика [13]. Поэтому если бактерия, такая как *E. coli*, получает плазмиду, содержащую ген с аминогликозид-3'-фосфотрансферазой, то клоны данной бактерии получают устойчивость к антибиотику канамицину.

Во многих случаях использование плазмидных векторов, содержащих ген устойчивости к канамицину, в молекулярном клонировании приводит к низкому выходу количества колоний или вообще к неудачному клонированию. Мы сообщаем о методике молекулярного клонирования ДНК в плазмиды, содержащие ген устойчивости к антибиотику канамицину, позволяющей проводить молекулярное клонирование также эффективно, как при использовании плазмиды, содержащей ген устойчивости к антибиотику ампициллину.

## МЕТОДЫ

**Молекулярное клонирование.** Плазмида pSB-IR-CA-EM7-Koz-NeoR-T2A-mCherry, использованная в экспериментах получена лигированием двух фрагментов ДНК. В качестве исходной плазмиды была использована плазмида pSB-IR-CA-EM7-Koz-PuroR-T2A-mGFP, ранее полученная в нашей лаборатории. В первом случае модельного клонирования ПЦР-фрагмент, содержащий ген канамицина, был амплифицирован из плазмиды pSLIK-NeoTGMiR-Luc (Addgene plasmid # 25745 ; <http://n2t.net/addgene:25745> ; RRID:Addgene\_25745) с использованием праймеров 43-NeoR-Koz-AgeI-F (GGTTGGACCGGTGCCACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACG) и 32-NeoR-AspA2I-R (GCCCTCCCTAGGGAAGAАCTCGTCAA GAAGGC), рестрицирован эндонуклеазами рестрикции AsiGI и AspA2I и клониро-

ван в плазмиду pSB-IR-CA-EM7-Koz-PuroR-T2A-mGFP по тем же сайтам рестрикции. В втором и третьем случаях модельного клонирования ПЦР-фрагмент, содержащий ген флуоресцентного белка mCherry, был амплифицирован из плазмиды pCDH-CMV-mCherry-T2A-Puro (Addgene plasmid # 72264 ; <http://n2t.net/addgene:72264> ; RRID:Addgene\_72264) с использованием праймеров 24-eGFP-NheI-F (GGCCCTGCTAGCGTGAGCAAGGGC) и 39-eGFP-BcuI-R (CCCGGGACTAGTTACCCGTGACSTTGTACAGCTCGTCC), рестрицирован эндонуклеазами рестрикции AsuNI и AhiI и клонирован в плазмиду pSB-IR-CA-EM7-Koz-PuroR-T2A-mGFP по тем же сайтам рестрикции.

**Трансформация.** Пробирку с компетентными клетками размораживали во льду, 25 мкл лигазной смеси, инкубировали 30 мин при 0°C. Затем прогревали смесь на водяной бане в течение 40–50 сек при 420°C, охлаждали до 0°C, добавляли 800 мкл среды SOC (2% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 8,55 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM глюкоза) и инкубировали от 0,5 до 5 часов при 37°C. Полный объем смеси высевали на чашку Петри с твердой средой LB (1% [w/v] бактотриптона; 0.5% [w/v] дрожжевого экстракта; 1% NaCl), содержащей соответствующие антибиотики. Инкубировали чашку при 37°C в течение 20 часов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Возможной причиной низкой эффективности молекулярного клонирования с использованием плазмид устойчивых к антибиотику канамицину может являться то, что антибиотик канамицин блокирует синтез белка, а для устойчивости бактерий *E. coli* к канамицину требуется синтез в достаточном количестве белка аминогликозид-3'-фосфотрансферазы. В этом случае для нормальной работы гена белка аминогликозид-3'-фосфотрансферазы необходимо чтобы белок уже присутствовал в достаточном количестве в клетке. Сразу после трансформации клетки плазмида находится в релаксированном состоянии и содержит одноцепочечные разрывы. В та-

ком состоянии деление плазмиды невозможно до завершения процесса репарации, а транскрипция может быть ограничена или вообще не происходить. Поэтому для нормального функционирования белка бактериальные клетки должны иметь уже функциональную плазмиду перед нанесением на чашку Петри, содержащую канамицин. Исходя из этого на эффективность

молекулярного клонирования с использованием плазмид, обеспечивающих устойчивость к канамицину, должно влиять время преинкубации трансформированных клеток перед посевом на чашки Петри с канамицином.

Для проверки данной гипотезы было предложено три модельных эксперимента молекулярного клонирования (рис. 1).

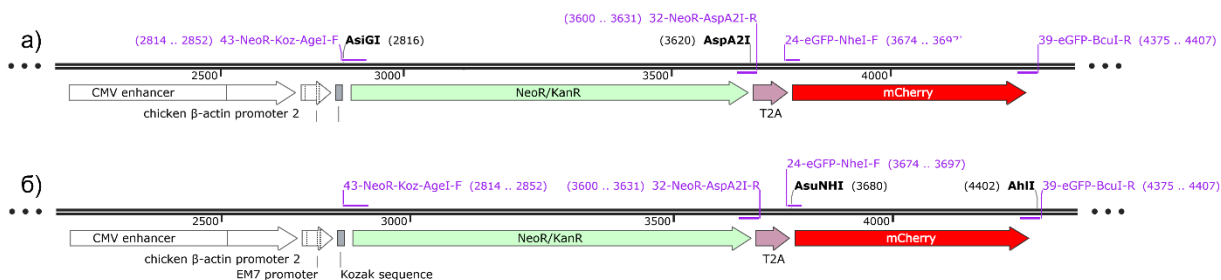


Рис. 1. Генетическая карта плазмиды, используемая в клонировании: а) сборка плазмиды в первом случае; б) сборка плазмиды во втором и третьем случае. Места одноцепочечных разрывов расположены на месте сайтов рестрикции AsiGI, AspA2I, AsuNHI и AhII.

В первом случае (разрывы перекрывают ген) в плазмиду клонируется непосредственно сам ген аминокликозид-3'-фосфотрансферазы, первый одноцепочечный разрыв фланкирует ген после промотора, второй – после стоп-кодона гена (рис. 1, а). Во втором случае (разрывы не перекрывают ген) последовательность модельного гена, в качестве которого выступает флуоресцентный белок, клонируется в плазмиду, содержащую ген аминокликозид-3'-фосфотрансферазы, одноцепочечные разрывы при этом находятся за тысячу нуклеотидов после гена аминокликозид-3'-фосфотрансферазы (рис. 1, б). В третьем случае (контроль с ампициллином), аналогично второму, последовательность модельного гена, в качестве которого также выступает флуоресцентный белок, клони-

руется в плазмиду, содержащую ген β-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину, отличие от второго случая заключается в среде посева клеток, содержащей ампициллин вместо канамицина (рис. 1, б).

Процедура молекулярного клонирования осуществлялась стандартным описанным способом [11]. После проведения процедуры трансформации также проводилась описанным способом [14], с единственным отличием, заключающимся в варьировании времени инкубации от 30 минут для 5 часов перед посевом на чашки Петри. После посева чашки Петри инкубировались в течении 20 часов и подсчитывалось количество колоний в каждой чашке (рис. 2).

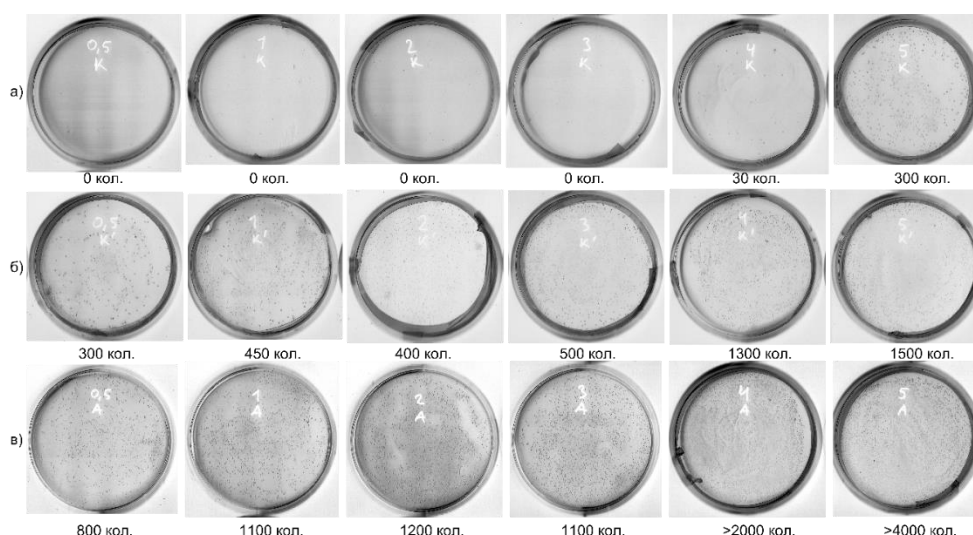


Рис. 2. Посев трансформированных клеток. Указано количество колоний на каждой чашке, относительная погрешность составляет 20%. а) первый случай, посев на канамицине; б) второй случай, посев на канамицине; в) третий случай, посев на ампициллине.

В первом случае (разрывы перекрывают ген) колонии появляются только в случае инкубации в течении четырех часов. После пяти часов инкубации количество колоний увеличивается в десять раз, но это, по-видимому, связано с тем, что клетки начинают делиться, поскольку аналогичное увеличение наблюдалось в третьем случае. Во втором случае (разрывы не перекрывают ген) колонии появляются уже сразу после 30 минут инкубации, после 4-х часов инкубации наблюдалось увеличение числа трансформатов. В третьем случае (контроль с ампициллином) количество колоний было практически неизменным в течении первых 3-х часов, но наблюдалось увеличение после 4-х – 5 часов. Поскольку присутствие ампициллина не влияет на жизнеспособность клеток, увеличение число колоний связано с делением клеток.

Данные результаты подтверждают предположение, что снижение эффективности молекулярного клонирования с использованием канамицина связано с репарацией ДНК. В первом случае одноцепочечные разрывы мешают транскрипции и аминокликозид-3'-фосфотрансфераза,

нейтрализующая действие канамицина не может синтезироваться немедленно. По прошествии 4-х часов повреждения плазмиды восстанавливаются и бактерии способны к делению на среде содержащей канамицин. В случае, если в плазмиде последовательность самого гена не повреждена, то данный эффект менее выражен и бактерии остаются жизнеспособными сразу после трансформации. В случае использования ампициллина увеличение времени инкубации после трансформации практически не сказывается на эффективности молекулярного клонирования, но длительное время (более 4-х часов) преинкубации приводит к тому, что клетки начинают делиться, что является нежелательным эффектом.

Таким образом, при молекулярном клонировании с использованием плазмид, обеспечивающих устойчивость к канамицину, можно рекомендовать увеличение времени инкубации в среде SOC после трансформации до 4-х часов. Такое увеличение времени позволяет проводить молекулярное клонирование с использованием канамицина более успешно.

## Библиографический список

1. Smith H.O., Welcox K.W. A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties // *Journal of Molecular Biology*. 1970. Vol. 51, № 2. P. 379-391.
2. Danna K., Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae* // *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1971. Vol. 68, № 12. P. 2913-2917.
3. Cohen S.N. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro // *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973. Vol. 70, № 11. P. 3240-3244.
4. Backman K., Ptashne M. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro // *Cell*. 1978. Vol. 13, № 1. P. 65-71.
5. Walhout A.J.M. et al. [34] GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes // *Methods in Enzymology* / ed. Thorner J., Emr S.D., Abelson J.N. Academic Press, 2000. Vol. 328. P. 575-IN7.
6. Siegel R.W. et al. Recombinatorial Cloning Using Heterologous Lox Sites // *Genome Res*. 2004. Vol. 14, № 6. P. 1119-1129.
7. Nebert D.W. et al. "Gene-Swap Knock-in" Cassette in Mice to Study Allelic Differences in Human Genes // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000. Vol. 919, № 1. P. 148-170.
8. Liu Q. et al. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes // *Current Biology*. 1998. Vol. 8, № 24. P. 1300-S1.
9. Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination // *Genome Res*. 2000. Vol. 10, № 11. P. 1788-1795.
10. Bethke B., Sauer B. Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants // *Nucleic Acids Research*. 1997. Vol. 25, № 14. P. 2828-2834.
11. Molecular Cloning. – [Electronic resource]. URL: <http://www.molecularcloning.com/> (accessed: 22.11.2022).
12. Wright G.D., Thompson P.R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism // *Front Biosci*. 1999. Vol. 4. P. D9-21.
13. Kotra L.P., Haddad J., Mobashery S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance // *Antimicrob Agents Chemother*. 2000. Vol. 44, № 12. P. 3249-3256.
14. Компетентные клетки. – [Electronic resource]. URL: <https://evrogen.ru/products/cloning/competent-cells>.

## MOLECULAR CLONING OF PLASMIDS WITH A KANAMYCIN-RESISTANCE GENE

**D.S. Naberezhnov**, *Candidate of Biological Sciences*  
**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences**  
**(Russia, Moscow)**

**Abstract.** *Molecular cloning is widely used in research and biotechnology for production plasmid and viral vectors. Molecular cloning methods do not require special laboratory equipment but they have many technical troubleshooting. Proteins influencing vital activity of the bacterial cell life of the transformed bacterial cells is one of difficulties of molecular cloning. We report the optimization of a molecular cloning technique using kanamycin as an antibiotic for selection of transformed cells.*

**Keywords:** *molecular cloning, kanamycin, troubleshooting molecular cloning, antimicrobial resistance.*