ПЛАЗМИДЫ СЕМЕЙСТВА pBS72 КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ

Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра генетики, 220030 Беларусь, Минск, пр. Независимости, 4.

Чалей В.А., Лагодич А.В., Карпиевич М.Н., Титок М.А., E-mail: LagodichAV@bsu.by

Повсеместно распространенные в природной среде обитания бактерии *Bacillus subtilits* способны утилизировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, продуцировать во внешнюю среду биологически активные соединения (ферменты, антибиотики, стимуляторы роста растений), являются весьма востребованными объектами биотехнологических отраслей производства, и первыми кандидатурами при разработке штаммов-продуцентов. Наличие полной нуклеотидной последовательности генома этих микроорганизмов позволяет целенаправленно изменять их свойства для биотехнологического использования. Одним из подходов, обеспечивающих детальное изучение регуляции экспрессии генов и улучшение практических свойств штаммов-продуцентов, является применение для этих целей векторных молекул, несущих чужеродный генетический материал. При этом в качестве векторов, как правило, используются внехромосомные генетические элементы, наиболее перспективными из которых являются плазмиды, реплицирующиеся согласно механизма тета-типа. Однако в настоящее время у бактерий *B. subtilis* наиболее изученными являются плазмиды, реплицирующиеся в соответствии с механизмом «катящегося кольца», в то время как плазмиды тета-типа практически не описаны. Однако именно плазмиды тета-типа являются наиболее перспективными в плане создания на их основе векторов для молекулярного клонирования. Поиск и характеризация плазмид среди природных штаммов этих микроорганизмов позволяет не только исследовать закономерности распространения репликонов определенного типа, но и выявить внехромосомные генетические элементы, обладающие новыми свойствами.

Внехромосомные генетические элементы могут служить основой при конструировании векторных молекул. Векторные системы широко применяемые для молекулярного клонирования в клетках грамположительных бактерий основаны на использовании RCR-плазмид. Недостатком этих векторов является структурная и сегрегационная нестабильность, которая определена самим механизмом репликациии. При репликации плазмид RCR-типа могут формироваться высоко-молекулярные линейные однонитевые структуры, представленные множественными копиями плазмидного генома (the HMW-forms). Образование таких структур и наличие в составе клонированной последовательности *chi* sites (5'-GCTGGTGG-3') существенно увеличивает вероятность рекомбинации между плазмидной и хромосомной ДНК, что и ведет к структурной и сегрегационной нестабильности. В отличии от RCR-плазмид плазмиды θ-типа не формируют HMW-структур и, следовательно, лишены указанных недостатков.

В связи с вышеизложенным наиболее предпочтительными элементами являются плазмиды, реплицирующиеся по механизму θ-типа. За исключением pLS20, плазмиды такого типа у *B. subtilis* не описанны, а данные об использовании pLS20 для конструирования векторов отсутствуют.

Настоящая работа посвящена изучению молекулярно-генетической организации плазмид θ-типа бактерий *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, и их использованию при создании векторов для молекулярного клонирования в клетках грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Bacillus subtilis*) бактерий.

Использование метода щелочного лизиса с последующим электрофоретическим анализом выделенной ДНК в 20 % случаев позволило выявить внехромосомные генетические элементы размером более 90 kb в клетках природных штаммов *B. subtilis,* изолированных из различных природных источников на территории Беларуси.

С использованием вектора pMTL21C были получены мини-репликоны трех плазмид, выделенных из штаммов 19, 57 и 72, и определены их размеры (табл. 1).

Таблица 1

Размеры полученных мини-репликонов

Штамм	Плазмида	Размер вставки, (kb)	Размер конструкции, (kb)	Название мини-репликона
19	pBS19	5,5	9,0	pMTLBS19
57	pBS57	2,9	6,4	pMTLBS57
72	pBS72	3,1	6,6	pMTLBS72

Полученные мини-репликоны эффективно трансформировали клетки типового штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* и стабильно наследовались в ряду поколений (вероятность утраты составляла 4-6% на 60 генераций).

Гибридизация по Саузерну позволила заключить, что изучаемые плазмиды имеют сходные *rep*-области, и не принадлежат ни к одному из известных семейств плазмид грамположительных бактерий, в частности pAMβ1, pTB19, pLS20 (плазмиды θ-типа) и pT181, pE194, pC194 (плазмиды RCR-типа). Размер исходных плазмид, а также отсутствие фракции однонитевой ДНК при репликации мини-репликонов pMTLBS19, pMTLBS57 и pMTLBS72, позволили предположить уникальность организации их репликативного аппарата и принадлежность к новому, еще не описанному семейству плазмид тета-типа.

Минирепликоны наследуются в клетках штамма *B. subtilis polA,* что говорит о независимости их репликации от функции ДНК-полимеразы I, что исключает их сходство с внехромосомными генетическими элементами, инициация репликации которых зависит от функции данного фермента, в частности, с широко распространенными среди грамположительных бактерий плазмидами тета-типа семейства pAMβ1.

Выяснение молекулярно-генетической организации *rep*-областей изучаемых плазмид осуществлялось путем секвенирования и функционального анализа делеционных и инсерционных изменений внутри клонированных мини-репликонов.

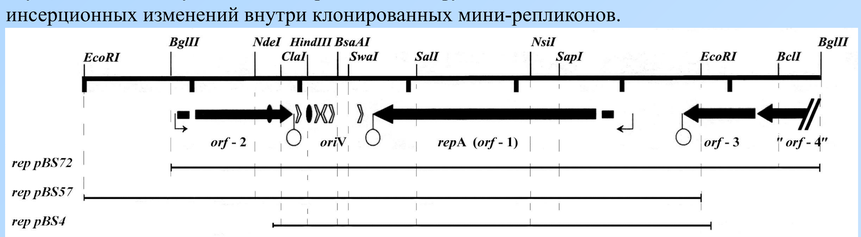

Рис. 1. Организация мини-репликонов плазмид pBS72 (3081 bp), pBS57 (2892 bp) и pBS4 (2076 bp). Обозначения: ↲ промотор, ■ последовательность Шайн-Дальгарно, ♦ терминатор; повторы ⟩⟨ – правая, ⟨⟩ – левая ориентация); *Dna*A связывающие последовательности (●). Открытые рамки считывания (*orf* - 1-4) детерминируют синтез полипептидов, состоящих из 344, 168, 113, 87 аминокислотных остатков, соответственно. Для репликации плазмид необходимы ген *rep*A и область, содержащая в своем составе ориджин вегетативной репликации - *ori*V.

В пределах секвенированных последовательностей обнаружено несколько открытых рамок считывания. Анализ первичной структуры белков, предположительно детерминируемых orf - 2 и orf - 3, не позволил выявить гомологии с известными. Однако достоверное сходство было обнаружено для полипептида, детерминируемого неполной открытой рамкой считывания orf - 4 с С-терминальной областью бактериальных белков из семейства ParA/Soj, обеспечивающих распределение дочерних молекул ДНК в процессе клеточного деления. Кроме того, для фрагмента полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания orf – 1, установлена гомология с N-терминальной последовательностью белка DnaA некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий, участвующего в инициации репликации хромосомы (рис. 2).

```
RepA  263   MTTEEEKVDSTLKSEMQNRVSKPSFDTWFKNTKI-KIENKNCL-LLV--PSEFAFEWIKKRYLETIKTVLEEA-GYVFE  336
            M   EE   +TLK +++ ++SKPSF+TW K+TK -+   K+ L-++ --P+EFA +W++ RYL  I  +L E
1 (13-68)                AQIEKKLSKPSFETWMKSTKA-HSLQGDTLTITA--PNEFARDWLESRYLHLIADTIYE
2 (14-63)                 QIEKKLSKPSFETWMKSTKA-HSLQGDTLIITA--PNEFARDWLESRYLHLI
3 (9-66)            NSALK-ELEKKVSKPSYETWLKSTTA-HNLKKDVLTITA--PNEFARDWLESHYSELISETL
4 (14-69)                EMKKKVSKPSYETWLRATKA-NALQNNDT-IIVTAPNEFARDWLEDHYSGLTSDIIEQ
5 (3-68)        EQEIWEKVLTLAQEKVSASYQTFLKDTKLFKLQNEQAI-VVT-DDDFVANWLKMNYAEIIKAALYEA
6 (3-74)        EQEIWKKVLEVAESEISKSTFNTFLKDTELKEIRDNVAI-IFV--IHEFYAEWLNSNYKEVIQTIMKDVIGYEVE
7 (2-71)      SEKEIWDKVLEIA-QERISNTSYQTFIKDTQLYSLKNDEAI-ILV--SLPFNASWLNQRYSEIMQAIIYDVIGY
8 (13-74)                  EEELSAQQFNTWIKPLRF-EAREGTLR-LLA--PNRFVQQWVKDRFLQKISALAEEV-LSTPVQIEL
9 (2-71)      SEKEIWDKVLEIA-QERISNTSYQTFIKDTQLYSLKNDEAI-ILV--SLPFNASWLNQRYSEIMQAIIYDVIGY
10 (12-65)               QLQEELPATEFSMWVRPLQA-ELNDNTLT-LFA--PNRFVLDWVRDKYLNSINRLLQE
11 (13-65)                LQEELPSAEFSMWVRPLQA-ELNDNTLT-LFA--PNRFVLDWVRDKYLNSINSLLNE
12 (13-67)                LRDELPAQQFNTWIRPLQV-EAEGDELR-VYA--PNRFVLDWVNEKYLGRVLELLDEH-G
13 (13-67)                LRDELPSQQFNTWIRPLQV-EAEGDELR-VYA--PNRFVLDWVNEKYLGRLLELLGER-G
14 (1-68)   MENIEELWSATLK-KIEEKLSKPSFDTWLKNTKA-EALEKDTL-IIS-APNEFARDWLENQYTNLISQMLLE
15 (9-68)          ERALKS-MEKKVSKPSFETWLKQTKA-NSIEDSTI-IIT-APNEFARDWLEKHYDELISETIDD
16 (11-72)            VQKSLQKTLSKPSFETWIRPAKF-NCFENGLL-TLI-APNTFSSDWLRKNYCETIEKTAKEICGY
17 (15-69)              SKLENELSKPSFETWLSSTYL-LDIEGDTL-IVSV-PNEFAKDWLESRYAPIIRSTVQ
18 (13-72)              AEIEQKISKPSFETWLKSTKA-HSLRGDTL-VIV-APNEFARDWLDSRYSHLIAETIYTITGE
19 (16-76)                LQLQLSKPTFETWIKTATA-EQLENNCL-VIR-APNPFARNWLQKYYIKTIADVVHDILGYPVE
20 (11-69)          SQVLERLQIELSRPTFETWIKTANA-ERLENNCL-VII-TPNPFARNWLQKYYISTIANVVQ
21 (10-68)          SQVLERLQIELSRPTFETWIKTANA-ERLENNCL-VII-TPNPFARNWLQKYYITTIANVVQ
```

Figure 2: Sequence analysis of the C-terminal region of *Rep*A (pBS72) with N-terminal domain of the *Dna*A protein of some Gram-positive and Gram-negative bacteria: 1 – *DnaA B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (the level of identity, similarity and the *E*-value are 35%, 63%, and $1*10^{-5}$, respectively); 2 – *Dna*A *B. licheniformis* DSM13; 3 - *Dna*A *B. anthracis*; *B. thuringiensis serovar konkukian* str. 97-27, *B. cereus* E33L; 4 - *Dna*A *B. clausii* KSM-K16; 5 - *Dna*A *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305; 6 - *Dna*A *Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435; 7 - *Dna*A *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; 8 - *Dna*A *Methylobacillus flagellatus* KT; 9 – *Dna*A *Haemophilus parasuis*;10 - *Dna*A *Vibrio harveyi*; 11 - *Dna*A *Vibrio fischeri* ES114;12 - *Dna*A *Pseudomonas fluorescens* Pf-5;13 - *Dna*A *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;14 – *Dna*A *Oceanobacillus iheyensis*;**15 – *Dna*A B. *halodurans* C-125 (the level of identity, similarity and the *E*-value are 42%, 64%, and $9*10^{-9}$, respectively);** 16 - *Dna*A *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9312;17 - *Dna*A *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2;18 – *Dna*A *Geobacillus kaustophilus* HTA426; 19 - *Dna*A *Trichodesmium erythraeum* IMS101; 20 – *Dna*A *Nostoc* sp. PCC 7120; 21 - *Dna*A *Anabaena variabilis* ATCC 29413.

Обсуждая выявленную гомологию белка, детерминируемого открытой рамкой считывания 1, с *Dna*A-белком хромосомного происхождения, хотелось бы отметить следующее. Для инициации репликации бактериальной хромосомы (в частности *E. coli*) на первом этапе происходит олигомеризация белка *Dna*A, который затем взаимодействует с областью *ori*C, обеспечивая локальное расплетение двунитевой ДНК в данном участке, тем самым обуславливая присоединение хеликазы. Эти процессы определяются N-терминальной последовательностью *Dna*A-белка. Возможно, что сходство организации первичной структуры С-терминальной последовательности *Rep*A-белка с N-терминальной последовательностью *Dna*A-белка позволяет белку *Rep*A выполнять аналогичные функции при инициации репликации плазмиды. Для остальной части белка, кодируемого *orf* - 1, гомологии с известными белками из банка данных выявлено не было, однако было показано, что в области между 111 и 132 аминокислотными остатками локализована ДНК-связывающая последовательность (HTH-сайт). Приведенные факты свидетельствуют в пользу того, что полипептидов, подобных обнаруженному, ранее описано не было. На этом основании можно предположить, что продукт, детерминируемый открытой рамкой считывания *orf* - 1, является новым *Rep*-белком, стимулирующим инициацию репликации плазмиды pBS72.

Последовательность протяженностью в 370 п.н., располагающаяся между открытыми рамками считывания 1 и 2, включает типичный *Dna*A-связывающий сайт (TTA TCC ACA), а также четыре прямых и один инвертированный повторы, имеющие сходные нуклеотидные последовательности (ATT AAA T(T/A) TT (A/G) A(T/C)), которые могут являться потенциальными сайтами связывания с белком, инициирующим репликацию. Кроме того, у 3′-конца второй открытой рамки считывания *orf* - 2 расположен еще один типичный *Dna*A-связывающий сайт. Выявленные закономерности позволяют предполагать, что анализируемая область представляет собой сайт начала вегетативной репликации (*ori*V) плазмиды pBS72 (рис. 1).

Отсутствие гомологии с охарактеризованными плазмидами RCR-типа и тета–типа позволяет заключить, что клонированный репликон представляет собой новый класс репликонов.

Результаты полимеразной цепной реакции *rep*-областей плазмид размером более 90 kb с последующим рестрикционным и сиквенс-анализом продуктов амплификации позволили продемонстрировать сходство их организации и отнести данные внехромосомные генетические элементы к новой систематической группе, включающей как минимум десять представителей, выявленных среди природных штаммов бактерий *B. subtilis,* выделенных на территории Беларуси.

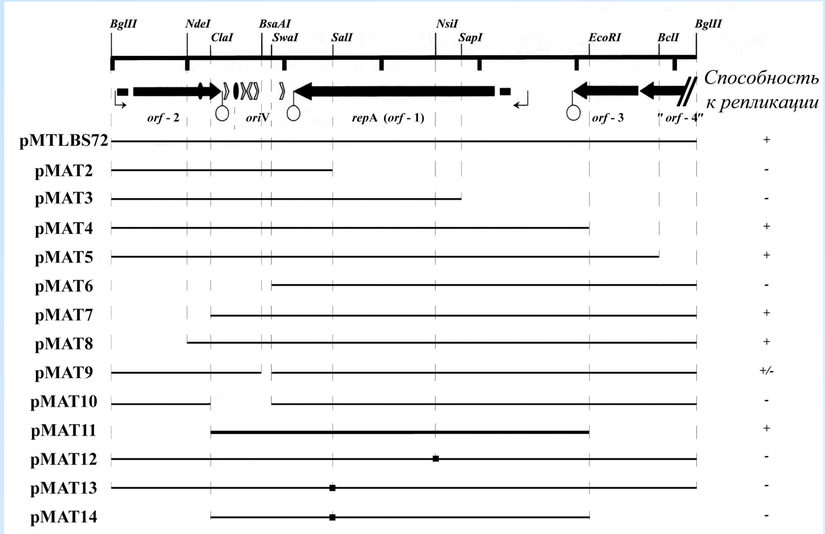

Рис. 3. Результаты функционального анализа rep-области плазмиды pBS72 бактерий *B. subtilis* бактерий *B. subtilis*. Делеционные (варианты pMAT2 – pMAT11) и инсерционные (варианты pMAT12 – pMAT14) мутанты были изолированы в бактериях *E. coli* и проанализированы на способность реплицироваться в бактериях *B. subtilis*: "+" – трансформирующая активность и стабильность наследования соответствует исходному варианту (вариантр pMTLBS72); "+/-" – трансформирующая активность и стабильность наследования на порядок ниже чем у исходного варианта; "-" – мутантные плазмиды не трансформируют бактерии B. subtilis, ■ – места инсерций. Минимальный репликон плазмиды pBS72 соответствует варианту pMAT11.

Результаты, полученные в ходе секвенирования и функционального анализа мини-репликона плазмиды тета-типа pBS72, изолированной из природного штамма *B.subtilis,* позволили изолировать их базовый репликон, пригодный для создания векторных молекул. Для его поддержания в клетках *B.subtilis* необходимо только наличие *rep*-гена и ориджина вегетативной репликации. Это послужило основанием для создания серии двурепликонных векторов на основе репликона плазмиды тета-типа pBS72 и плазмиды pMTL21C (рис. 4).

В качестве базовой конструкции, обеспечивающей поддержание векторных молекул в клетках *E. coli*, использовали многокопийную плазмиду pMTL21C, несущую ColEI-репликон, ген ампициллинрезистентности (Amp), выражающийся в *E. coli*, и ген устойчивости к хлорамфениколу (Cm), экспрессирующийся в бактериях *B. subtilis*, а также полилинкер, включенный в ген *lacZ′*. Наличие полилинкера, содержащего 21 уникальный сайт, позволяет клонировать фрагменты ДНК, вызывая при этом инактивацию гена *lacZ′*, выявляемую по формированию неокрашенных колоний на селективной среде, содержащей IPTG и X-Gal. Кроме того, в составе плазмиды pMTL21C содержится несколько уникальных сайтов (в частности, AflII-сайт), которые не затрагивают ни одну из указанных выше функциональных единиц и могут быть использованы для клонирования *rep*-области плазмиды pBS72.

Путем клонирования продукта амплификации *rep*-области плазмиды pBS72 в сайт AflII вектора pMTL21C были получены конструкции pMTL7-1, pMTL7-2 и pAL1. Полученные конструкции являются векторами общего назначения и пригодны для клонирования и секвенирования генетического материала. При этом экспрессия встроенных фрагментов ДНК в составе данных векторных молекул осуществляется с *tac*-промотора, индуцируемого в клетках *E. coli* и способного обеспечить базовый уровень экспрессии в клетках *B. subtilis*.

```
  + 1     lacOid operator   M13/pUC reverse sequencing primer (-26), 17-mer
5′-  AA TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG CCT CGA GAT CTC
                                                                M   T   M   I   T   P   S   L   H
A   C   R   P   R   D   L
                                                   M13/pUC sequencing primer (-20), 17-mer
CAT GGA CGC GTG ACG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GA - 3′
H   G   R   V   T   S   T   L   E   D   P   R   V   P   S   S   N
S   L   A   Y   Y   L   S   LacZ
```

Рис. 4. Молекулярно-генетическая организация векторов общего назначения.
На рисунке указана локализация сайтов рестрикции и детерминант: oriEc – ColE1-репликон, обеспечивает наследование в клетках *E. coli*; oriV и Rep – *rep*-область плазмиды pBs72, обеспечивает наследование репликона в клетках *B. subtilis*; MCS - полилинкер размером 78 bp, несущий 16 сайтов, пригодных для молекулярного клонирования, фланкирован праймерами M13/pUC, расположен в N-терминальной последовательности гена *lacZ′*; маркеры устойчивости к ампициллину (Amp) и хлорамфениколу (Cm), выражающиеся в бактериях *E. coli* и *B. subtilis*, соответственно.

Нами было показано, что ориентация клонированной rep-области не оказывает влияния на способность плазмиды наследоваться в клетках *E. coli* и *B. subtilis.* В следующей серии экспериментов было установлено, что эффективность трансформации клеток *E. coli* и *B. subtilis* препаратами плазмидной ДНК составляет 10^6 и 10^5 клеток на 1μg ДНК, соответственно.

Созданный вектор в равной степени пригоден для клонирования в системах *E. coli* и *B. subtilis.* При этом число плазмидных копий в реципиентных бактериях *E. coli* соответствует ColEI-репликону, а в бактериях *B. subtilis* - репликону pBS72 (5-6 копий). Полученный вектор характеризуются высокой емкостью (до 10 kb) и выраженной структурной и сегрегационной стабильностью в клетках бактериальных хозяев *E. coli* и *B. subtilis*. Для созданной конструкции известна полная нуклеотидная последовательность ДНК, что позволяет осуществлять с ней различного рода манипуляции, в том числе создавать новые векторные молекулы (например, векторы специального назначения), что и было предпринято в дальнейшем.

Варианты с измененным числом копий могут служить основой для конструирования векторных систем, а также для изучения тонких механизмов репликации и сегрегации. Для изменения числа копий мини-репликона плазмиды pBS72, детерминирующего устойчивость к хлорамфениколу в концентрации 5 мкг/мл использовали химический мутагенез *in vitro* (гидроксиламин). Мутантные конструкции были отобраны путем прямой селекции трансформантов *B. subtilis* 168 *trp*C2 на средах с повышенной концентрацией хлрамфеникола (50 мкг/мл). Мутационные изменения, приводящие к увеличению числа копий плазмидного репликона, были картированы путем секвенирования. На основании анализа электрофореграмм было установлено увеличение отношения фракций плазмидной ДНК к хромосомной от 2 до 10 раз по сравнению с исходным вариантом, что свидетельствовало об увеличении числа копий исследуемых мутантов.

Мутации были выявлены в области *dna*A-бокса, *ori*V-сайте и *rep*A-гене. В последовательности *dna*A-бокса, примыкающего к сайту *ori*V, обнаружены три точечные делеционные мутации, причем одна из них, присутствовала во всех проанализированных вариантах. В области *ori*V достаточно часто обнаруживалась замена аденина на гуанин в последовательности инвертированного повтора (обнаружена у пяти из семи проанализированных мутантов). В пределах *rep*A-гена выявлены трансверсии и транзиции, приводящие к изменению в области домена полипептидной цепи *Rep*A, предположительно обладающего ДНК-связывающей активностью, а также транзиции в области характерной для доменов с АТФ-азной активностью.

Подобно исходному мини-репликону плазмиды pBS72 все исследованные мутантные варианты характеризовались стабильностью наследования в клетках типового штамма *B. subtilis* 168 *trp*C2 и утрачивались с частотой более 90% из бактерий *B. subtilis* L1432, несущих мутацию гена *dnaB*19. Исключение составил вариант, содержащий транзицию в области инвертированного повтора *ori*V сайта и делецию последовательности *dna*A-бокса (стабильность наследования увеличилась в 10 раз). Исходя из возможных фукций белка *Dna*B, можно предположить, что изменение в области инициации репликации приводит не только к изменению числа копий, но также влияет на процессы распределения дочерних молекул плазмидной ДНК в процессе деления.

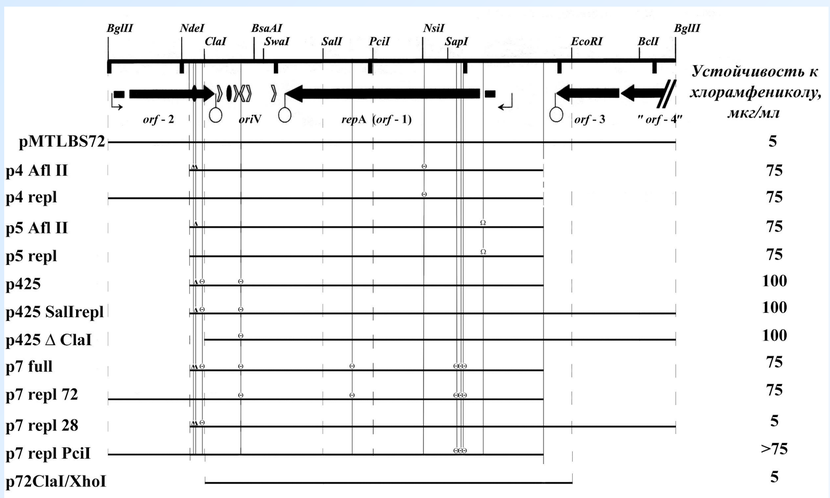

Рис. 5. Локализация мутаций в пределах *rep*-области плазмиды pBS72.
Обозначения мутаций: инсерции (Ω), делеции (Δ), транзиции и трансверсии (Θ).

У всех мутантов были обнаружены изменения в терминальной области orf2. Поскольку в использованном мини-репликоне orf2 является неполной, а одна из делеций характерна для всех охарактеризованных мутантов, то возникшие изменения копийности могут быть связаны в т.ч. с функцией dnaA-бокса, локализованного в пределах orf2, и примыкающих к нему областей. Интересно, что одна из транзиций mut7 затрагивает центральный район инвертированного повтора области oriV (ttaaAatttaat → ttaaGatttaat), и может изменять его предполагаемую функцию мишени для посадки регуляторной молекулы.

Помимо описанных выше мутаций у *mut*4 в пределах *rep*A-гена выявлена трансверсия G→T в позиции 286, приводящая к замене A→S (97) в области ДНК-связывающего домена полипептидной цепи *Rep*A, а у *mut*7 - 4 транзиции A→G в позициях 82, 85, 152, 607, приводящие к аминокислотным заменам K→E (28), R→G (29), E→G (51) того же домена *Rep*A, и в области домена, ответственного за АТФ-азную активность - N→D (223). У *mut*5 выявлена инсерция C между старт-кодоном *rep*A-гена и последовательностью Шайн-Дальгарно (RBS): 5'- gatcgcgggagggCacattATG –3', что может изменить уровень экспрессии *rep*A-гена и, как следствие, концентрацию *Rep*A в клетке.

На следующем этапе работы были осуществлены эксперименты по установлении связи между типом мутационного изменения и его фенотипическим проявлением, детектируемым по уровню устойчивости к антибиотику, данные представлены на (рис 5).

Заключение

Система бирепликонных векторов была создана на базе репликона новой плазмиды тета-типа pBS72 и репликона плазмиды pBR322. Данные вектора эффективно трансформируют клетки *E. coli* и *B. subtilis* (10^6 и 10^5 клеток на 1 мкг ДНК), структурно и сегрегационно стабильны, однако копийность указанных векторов в клетках *B. subtilis* не велика (5-6 копий). С использованием химического мутагенеза удалось получить варианты, демонстрирующие устойчивость к повышенным концентрациям антибиотика.

References

1. Anagnostopoulos C., Spizizen J. // J. Bacteriol. – 1961. – Vol. 81, № 5. - P. 741–746.
2. Birnboim H. L. Doly J. // Nucl. Acids. Res. – 1979. – Vol. 7, № 6. – P. 1513–1523.
3. Bron S. Plasmids // Molecular Biological Methods for *Bacillus.* Ed. Harwood C.R. - John Wiley and Sons Ltd, Chichester. – 1990. – p. 75–174.
4. Kozlovskiy Yu.E., Prozorov A.A. // Reports of AS USSR. – 1981. – Vol 258, № 6. – P. 1457–1459 (in Russian).
5. Lagodich A.V., Cherva E.A., Shtaniuk Ya.V., Prokulevich V.A., Fomichev Yu.K., Prozorov A.A., Titok M.A. // Molecular Biology. –2005. – Vol. 39, № 2. – P. 306–309.
6. Lagodich A.V., Shtaniuk Ya.V., Prozorov A.A., Titok M.A. // Molecular Biology. – 2004. – Vol. 38, № 3. – P. 366–369.
7. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed./Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Publications, NY.- 1989.-468 P.
8. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Janniere L. // Plasmid. – 2003. – Vol. 49, № 1. – P. 53–62.