

Ген *срп60-1*, кодирующий один из гомологичных шаперонинов у *Rhizobium leguminosarum*, является важным для жизнедеятельности клетки

В. Н. Ерко, П. А. Ланд¹

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

¹Школа биологических наук, Бирмингемский университет
Бирмингем, B15 2TT, Англия

С использованием метода сайт-специфического мутагенеза сделана попытка построить нок-аут мутацию одного из трех гомологичных генов для синтеза шаперонинов в *R. leguminosarum*. Показано, что ген *срп60-1* не может быть выведен из строя в связи с его важностью для жизнедеятельности клетки.

Введение. Для того чтобы белки могли реализовать свои свойства, какими бы они ни были — каталитическими, регуляторными, структурными и т. д., каждый индивидуальный белок должен приобрести специфическую для него конформацию в пространстве. На протяжении длительного периода полагали, что процесс сборки белков — это спонтанный процесс, не требующий дополнительных факторов или энергетических затрат [1]. Как позже обнаружилось, спонтанная сборка белков характерна для несложных, чаще однодоменных полипептидов, состоящих из небольшого количества аминокислот. Белки, имеющие сложную третичную и четвертичную структуру, собираются с помощью шаперонов — семейства белков, обнаруженных у всех видов прокариот, эукариот и архея [2].

У бактерий существует несколько шаперонов различного рода. Наиболее изученными из них являются шапероны DnaK — белки с молекулярной массой 70 кДа и шапероны Срп60 (или GroEL), получившие название шаперонины, с молекулярной массой 60 кДа.

Обе группы обладают АТФазной активностью (используют энергию АТФ для своей работы) и чрезвычайно консервативны по аминокислотной последовательности. Из сравнения аминокислотных

последовательностей этих шаперонов, выделенных из *Escherichia coli* и организма человека, следует, что гомология между ними составляет более 50 %. Это свидетельствует о высокой консервативности функций, выполняемых шаперонами, и древности их происхождения [3, 4].

Мутации, полностью выводящие из строя шаперонин GroEL у бактерии *E. coli*, летальны, так как этот шаперонин является абсолютно необходимым для нормального роста при любых температурах [5]. Делеция гена шаперона DnaK приводит к чрезвычайной холодо- и теплочувствительности бактерий, которые при этом не способны расти при температурах, значительно отличающихся от 30 °С [6].

Обычно бактерии содержат одну копию генов для синтеза шаперонинов. В отличие от *E. coli* и большинства других бактерий, клубеньковые бактерии *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* в составе своего генома имеют множественные семейства генов, кодирующих гомологичные шаперонины. Так, *R. meliloti* и *B. japonicum* имеют пять гомологичных генов *groEL* [7, 8], а *R. leguminosarum* — три гена, названных *срп60-1*, *срп60-2* и *срп60-3* [9], экспрессирующихся либо конститутивно, с усиленным синтезом при воздействии на бактерии повышенной температуры, либо в зависимости от условий роста и при симбиозе с растениями [8].

Значение множественности генов для синтеза гомологичных шаперонинов, синтезирующихся в разных условиях, так же, как и существование в одной клетке шаперонинов, отличающихся по аминокислотной последовательности, и возможная роль этих шаперонинов в азотфиксирующем симбиозе клубеньковых бактерий с растениями остаются невыясненными. Хотя показано, что Tn5 мутация одного из генов *groEL* у *R. meliloti* приводит к инактивации NodD1, NodD3 и SycM регуляторов экспрессии генов и в результате к отсутствию азотфиксации [10]. Такой же фенотип в симбиозе с бобовыми характерен для мутантов *B. japonicum*, несущих нок-аут мутации по двум из пяти генов *groEL* этого микроорганизма, кодирующих шаперонины.

Предметом данной работы является конструирование мутаций по одному из трех гомологичных генов *сrn60*: *R. leguminosarum* и проблема построения мутаций в этих генах.

Материалы и методы. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Среды и условия роста. Штаммы *E. coli* выращивали на твердой или жидкой среде LB [13] при температуре 37 °С, а *R. leguminosarum* — на TY [14] или С79 [15] при 28 °С. Для получения мутантов скрещивали *R. leguminosarum* с *E. coli* при температуре 28 °С на среде TY в течение ночи при соотношении клеток 5:1 соответственно. Мутанты *R. leguminosarum*, у которых произошел

один акт рекомбинации с плазмидой *pNW61* или *pND61* (интеграция плазмиды в геном), отбирали на среде С79 с добавлением 500 мкг/мл стрептомицина и 200 мкг/мл канамицина. После этого проверяли отсутствие роста клонов *R. leguminosarum*, появившихся на этой среде, на среде TY с 5 %-й сахарозой и 500 мкг/мл стрептомицина и осуществляли блот-гибридизацию геномной ДНК этих клонов с соответствующим геном *сrn60* для определения правильности встраивания плазмиды в нужный оперон.

Мутанты, у которых произошло замещение гена *сrn60-1* на мутантный аналог *сrn60::nptII* или на фрагмент с геном *nptII* за геном *сrn60-1*, отбирали на среде TY с 5 %-й сахарозой и 200 мкг/мл канамицина. Колонии, выросшие на этой среде, проверяли на отсутствие устойчивости к гентамицину в концентрации 10 мкг/мл на среде TY.

Работа с ДНК. Ферменты для работы с ДНК приобретены у «BRL», «Promega» (США) и «New England Biolabs» (Англия) и использованы в соответствии с инструкциями [13]. Препараты геномной ДНК готовили с использованием протеиназы К и ацетилтриметиламмонийного брома [16]; препараты плазмидной ДНК — по методу Бирнбойма и Доли [17].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакции амплификации ДНК с помощью ПЦР *Taq*-полимеразы проводили в термоциклере Techne DV3. Амплификацию части гена *сrn60-1* для блот-гибридизации осуществляли с помощью праймеров

Таблица 1
Бактериальные штаммы и плазмиды.

Штаммы и плазмиды	Фенотип и генотип	Источник
Бактерии:		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 8401/ <i>pRL1</i>	Sig ^R (600 мкг/мл), Fix ⁺	[9]
<i>R. leguminosarum</i> NW61M	Производный от штамма <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 8401/ <i>pRL1</i> , несет плазмиду <i>pNW61</i> в хромосоме	Данная работа
<i>R. leguminosarum</i> ND61M	Производный от штамма <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 8401/ <i>pRL1</i> , несет плазмиду <i>pND61</i> в хромосоме	Данная работа
<i>R. leguminosarum</i> ND61H	Производный от штамма <i>R. leguminosarum</i> ND61M; контроль опыта; несет в хромосоме ген <i>nptII</i> , встроены за геном <i>сrn60-1</i>	Данная работа
<i>E. coli</i> S17.1	Sig ^R (200 мкг/мл); несет плазмиду <i>RP4-2/Tc::Mu</i> , интегрированную в хромосому и утратившую маркеры Ap ^R , Tc ^R , Km ^R	[11]
Плазмиды:		
<i>pJQ200KS</i>	Gm ^R , sacB, P15A ori	[12]
<i>pNW61</i>	Производная <i>pJQ200KS</i> (рис. 2, а); <i>сrn60::nptII</i>	Данная работа
<i>pND61</i>	Производная <i>pJQ200KS</i> ; <i>nptII</i> встроены за <i>сrn60</i>	Данная работа

D13222 и D2753 при следующих условиях: денатурация (93 °С, 1 мин 45 с); отжиг (54 °С, 1 мин 45 с); синтез (72 °С, 1 мин 45 с). Олигонуклеотиды синтезированы компанией «Alta Bioscience» (Англия).

Блот-гибридизация по Саузерну. Рестрицированную ДНК после электрофореза в 0,7 %-й агарозе переносят на нейлоновые мембраны, как описано [13]. Мембраны отмывали в условиях высокой ионной силы. Пробы для гибридизации метили с использованием набора «Renaissance» для флюоресцентного мечения при помощи случайных праймеров с флюоресцеин-dUTP.

Результаты и обсуждение. Для проведения мутагенеза гена *срп60-1*, кодирующего один из гомологичных шаперонинов у *R. leguminosarum*, был использован оперон *срп10-1*, *срп60-1* этой бактерии (в дальнейшем оперон *срп-1*), клонированный ранее [9]. Физическая карта этого оперона представлена на рис. 1, а. В этом опероне ген *срп10-1* кодирует ко-шаперонин Срп10, работающий совместно с шаперониновым комплексом, который в свою очередь состоит из 14 гомологичных субъединиц; кодируемых геном *срп60*. Для инактивации работы шаперонина Срп60-1 необходимо было либо делетировать, либо инактивировать ген *срп60-1*. Поэтому при получении мутантов *R. leguminosarum* с отсутствием синтеза шаперонина Срп60-1 была использована система для направленного мутагенеза на основе плазмиды-«самоубийцы» *pJQ200KS* [12], поскольку длина клонированного фрагмента оперона *срп-1* позволяла использовать метод сайт-специфического мутагенеза, т. е. рекомбинацию между гомологичными фрагментами (длина клонированного фрагмента оперона *срп-1* составляет 3,3 тыс. п. н.).

Плазмида *pJQ200KS* несет маркер устойчивости к гентамицину и ген *sacB*, экспрессия которого в бактериях, растущих на средах с содержанием

сахарозы около 5 %, приводит к гибели этих бактерий. Эта плазмида обладает узким кругом хозяев благодаря ее P15A ориджину репликации и не способна реплицироваться в *R. leguminosarum* в отличие от *E. coli*. Кроме этого, она несет *mob*-фрагмент плазмиды *RP4*, позволяющий ее конъюгационный перенос в *R. leguminosarum* из *E. coli* S17.1. Поэтому при скрещивании *R. leguminosarum* *bv. viceae* 8401/*pRL1* с *E. coli* S17.1, несущей плазмиду *pJQ200KS*, эта плазмида мобилизуется в клубеньковые бактерии и либо элиминирует из клеток ризобий в связи с невозможностью ее репликации в этих бактериях, либо встраивается в геном бактерий, но только в том случае, если несет в своем составе фрагменты ДНК, имеющие гомологию с геномной ДНК ризобий. Так, если в клетку в составе плазмиды вводится фрагмент ДНК, несущий мутированный ген *срп60-1*, в который встроены ген *nptII*, кодирующий неомизинфосфотрансферазу, придающую клеткам устойчивость к антибиотикам канамицину (рис. 1, б и 2, а), то в результате рекомбинации произойдет встраивание всей плазмиды в хромосомную копию этого гена таким образом, что в геноме бактерии окажется как мутированный, так и исходный ген, разделенные плазмидной ДНК (рис. 2, б).

В результате второго акта рекомбинации может произойти вырезание плазмиды *pJQ200KS* из генома (рис. 2, б и в). При этом, если имеется хорошая система для отбора клеток, несущих мутантный ген, то в клетке остается только этот мутантный ген, а ген дикого типа элиминирует вместе с плазмидой. В нашем случае для направленного мутагенеза был использован оперон *срп-1* с встроенным в качестве маркера *nptII*-геном устойчивости к канамицину для отбора мутантов клубеньковых бактерий, в которые произошло встраивание плазмиды с мутантным геном *срп60-1*, и мутантов, у которых в результате второй реком-

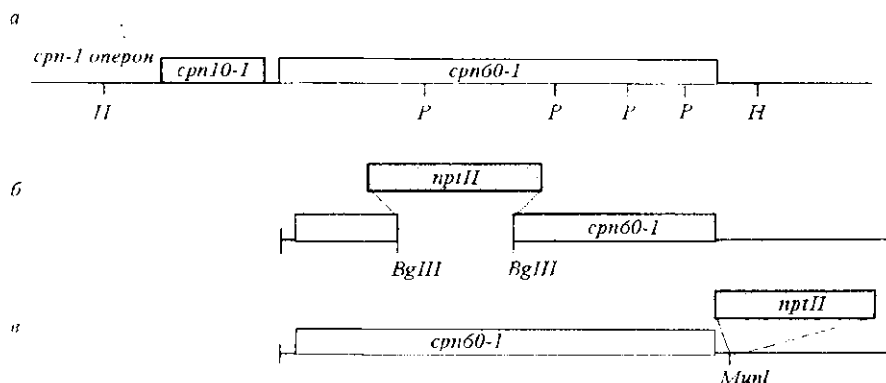


Рис. 1. Физическая карта оперона *срп-1* (а) и схема создания мутантного гена *срп60-1* с инсерцией *nptII* в нем (б) и контрольного — с инсерцией *nptII* за геном (в); H — *HindIII*, P — *PstI*. Объяснения см. в тексте

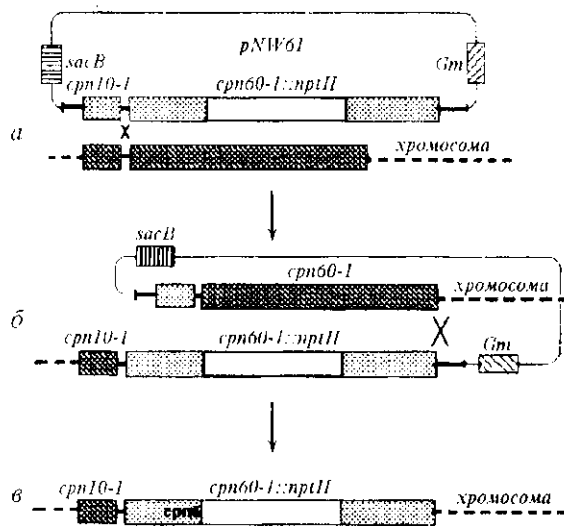


Рис. 2. Схема сайт-направленного мутагенеза гена *cpn60-1* с использованием плазмиды *pNW61* (предшественник *pJQ200KS*). Масштабность не соблюдена. Показано первое рекомбинационное событие (а), инсерция плазмиды в хромосому с последующим (вторым) актом рекомбинации (б) и получившейся хромосомной конструкцией (в)

бинации ген дикого типа замещен на мутированный ген. Однако поиск бактерий, у которых произошли второй акт рекомбинации и замещение гена дикого типа на мутированный, был бы значительно затруднен среди большого числа бактерий, где не произошло вырезания плазмиды, если бы не наличие в этой плазмиде гена *sacB*, блокирующего рост бактерий на сахарозе. Поэтому поиски бактерий, у которых произошел второй кроссинговер между мутированным и нормальным генами, проводили на среде ТУ с добавлением сахарозы, и клоны, появляющиеся на этой среде, проверяли на отсутствие маркера устойчивости к гентамицину, присущему данной плазмиде.

Известно, что если ген, кодирующий синтез шаперонина в клетке, находится в единичной копии, то мутации, полностью выводящие из строя этот ген, летальны. У *R. leguminosarum* *bv. viceae* имеются три гомологичных гена, кодирующих шаперонина *Срп60*. Поэтому делеция отдельного гена *cpn60* является возможной, хотя может быть и летальной. В случае невозможности получения мутантов *R. leguminosarum* по гену *cpn60-1* можно сделать вывод о том, что эти мутации летальны для клетки. Однако для того чтобы с уверенностью утверждать о том, что мутанты по гену *cpn60-1* летальны, необходим контроль, который бы ясно показал, что метод, примененный для получения

мутантов, действительно работает в данном конкретном случае, а отсутствие мутантов связано с их летальностью, а не с тем, например, что фрагмент ДНК, использованный для гомологичной рекомбинации, слишком короток и рекомбинация происходит с очень низкой частотой, что и приводит к видимости отсутствия мутантов.

Поэтому для получения мутантов по гену *cpn60-1* мы сконструировали производные плазмиды *pJQ200KS*, несущие оперон *cpn-1* и ген *nptII* в разных положениях (рис. 1). При получении мутантов *R. leguminosarum* по *cpn60-1*-гену плазмида *pNW61* несла ген *nptII* в гене *cpn60-1* (рис. 1, б и 2, а), а плазмида *pND61* — на 20 нуклеотидов ниже кодона терминации трансляции этого гена (рис. 1, б). Таким образом, получение клубеньковых бактерий, несущих ген *nptII* за геном *cpn60-1*, является контролем опыта и свидетельствует о его эффективности.

Ген *nptII* встраивали в ген *cpn60-1* по его двум сайтам *BglII* (*BglII* 1546—*BglII* 2048) с делецией фрагмента гена *cpn60-1* длиной 499 п. н. и клонированием фрагмента в плазмиду *pJ11891*. В дальнейшем фрагмент *cpn10-1, cpn60-1::nptII* длиной 4,6 тыс. п. н. был реклонирован в плазмиду *pJQ200KS* по ее *SmaI*-сайту (тупые концы) и *EcoRI*-сайтам фрагмента с заполнением его 5'-липких концов с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы I. Конструирование контрольной плазмиды с геном *nptII*, находящимся за геном *cpn60-1*, производили подобным образом, за исключением того, что *nptII*-ген встраивали в *MunI*-сайт, находящийся на 20 п. н. ниже терминирующего кодона гена *cpn60-1*.

В результате скрещивания штамма *E. coli* S17.1, несущего в своем составе *pNW61* или *pND61*, с *R. leguminosarum* были получены клоны *R. leguminosarum* NW61M и *R. leguminosarum* ND61M, несущие в своем геноме соответствующие плазмиды в составе хромосомы как результат первого акта кроссинговера (см. рис. 2, б). Правильность встраивания плазмид по гомологии с опероном *cpn-1* была подтверждена с помощью блот-гибридизации по Саузерну с использованием в качестве метки *nptII* гена плазмиды *pANU2* (данные не приведены), а также гена *cpn60-1*, амплифицированного с плазмиды *pC15K1* с использованием праймеров D13222 и D2753 («Alta Bioscience») (см. «Материалы и методы») (рис. 3, дорожки 3 и 4). Частоты возникновения клонов клубеньковых бактерий, у которых произошло встраивание в геном плазмид *pNW61* и *pND61*, представлены в табл. 2. Следующим шагом в получении мутантов является отбор среди клонов *R. leguminosarum*

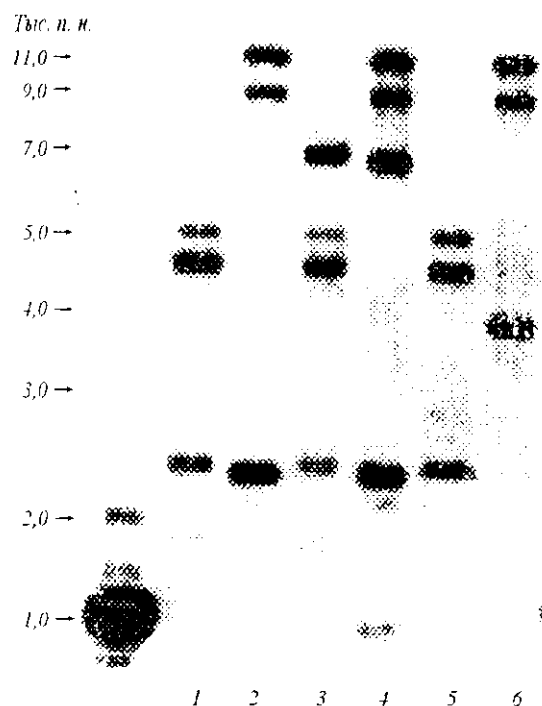


Рис. 3. Результаты блот-гибридизации по Саузерну геномной ДНК производных штамма *R. leguminosarum* *bv. viceae* 8401/pRL1, рестрицированной *Pst*I; 2 — то же *Hind*III; 3 — *R. leguminosarum* NM61M, рестрицированная *Pst*I; 4 — то же *Hind*III; 5 — *R. leguminosarum* ND61H, рестрицированная *Pst*I; 6 — то же *Hind*III. Полоса гибридизации 2,3 тыс. п. н. в контрольной линии 2 соответствует полному оперону *crp-1* (см. рис. 1, а), а полосы гибридизации 9 и 11 тыс. п. н. — оперонам *crp-2* и *crp-3*.

NW61M и *R. leguminosarum* ND61M таких, у которых произошел второй кроссинговер с замещением гена дикого типа на мутантный или контрольный с одновременным вырезанием плазмиды (рис. 2, б и в). Частоты возникновения таких клонов представлены в табл. 3, а результаты их блот-гибридизации по Саузерну — на рис. 3, дорожки 5 и 6.

Как видно из табл. 3, частота возникновения контрольных клонов *R. leguminosarum* ND61H, несущих ген *nptII* за неповрежденным геном *crp60-1* (см. рис. 1, а), соответствует средней частоте возникновения рекомбинаций, известной для *R. leguminosarum*. В то же время ни одного случая возникновения мутантов *R. leguminosarum*, у которых произошло замещение гена *crp60-1* на мутантный ген *crp60-1::nptII*, обнаружено не было. Все клоны *R. leguminosarum* NW61M, появившиеся на среде с сахарозой и добавлением неомицина и стрептомицина, продолжали нести в составе генома плазмиду pNW61 (с геном *sacB*, в котором, очевидно, произошла мутация, что и привело к устойчивости этих клонов к сахарозе) или часть этой плазмиды.

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что один из генов *crp60*, кодирующих гомологичные шаперонины у клубеньковых бактерий гороха *R. leguminosarum* *bv. viceae* 8401/pRL1, а именно: ген *crp60-1*, невозможно «вывести из строя», так как это приводит к гибели бактерий.

Существует несколько объяснений полученным результатам. Во-первых, гомологичные гены *crp60-2* и *crp60-3* не экспрессируются или их экспрессии недостаточно для поддержания процесса сборки белков на уровне, обеспечивающем нормальную жизнедеятельность клетки. Действительно, данные

Таблица 2

Частоты возникновения клонов *R. leguminosarum* с плазмидой pNW61 или pND61 в геноме, полученные в результате переноса этих плазмид из штамма *E. coli* S17.1 в *R. leguminosarum* *bv. viceae* 8401/pRL1

Штамм и его характеристика	Частота интеграции плазмиды pNW61 или pND61 в хромосому	Количество проверенных клонов
<i>R. leguminosarum</i> NW61M (плазмида pNW61 с геном <i>nptII</i> , встроенным в <i>crp60-1</i> , находится в составе бактериальной хромосомы)	$1 \cdot 10^{-7}$	200
<i>R. leguminosarum</i> ND61M (плазмида pND61 с геном <i>nptII</i> , встроенным в <i>crp60-1</i> , находится в составе бактериальной хромосомы)	$2 \cdot 10^{-7}$	200

П р и м е ч а н и е. Частоты возникновения Nm^R, Gm^R, сахарозочувствительных клонов показаны как среднее четырех независимых скрециваний.

Таблица 3

Получение штамма *R. leguminosarum* с замещением гена *сrn60-1* на мутантный *сrn60-1::nptII* и контрольного штамма с геном *nptII*, встроеным за *сrn60-1*

Исходный штамм	Частота выживания плазмиды <i>pNW61</i> или <i>pND61</i> из генома	Частота возникновения мутантов по гену <i>sacB</i> *	Частота замещения гена <i>сrn60-1</i> на мутантный <i>сrn60-1::nptII</i> или на кон-струкцию <i>сrn60-1, nptII</i>
<i>R. leguminosarum</i> NW61M	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-6}$	0**
<i>R. leguminosarum</i> ND61M	$9,6 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$	$5,7 \cdot 10^{-6}$ ***

*Подсчитана как частота возникновения Nm^R , сахарозоустойчивых клонов; **100 % — мутации в гене *sacB* (проверены 800 клонов); ***91 % — замещение гена *сrn60-1* на конструкцию *сrn60-1* с *nptII* за этим геном; 9 % — мутации в гене *sacB* (проверены 100 клонов).

об экспрессии оперонов *сrn-1* и *сrn-3* *R. leguminosarum*, полученные в результате исследований с помощью РТ-ПЦР (ПЦР тотальной матричной РНК с использованием ревертазы), показывают, что экспрессия оперона *сrn60-1* конститутивна, а оперон *сrn-3* экспрессируется только в микроаэробных условиях (П. А. Ланд, личное сообщение). Во-вторых, в случае, если оперон *сrn-2* экспрессируется на достаточно высоком уровне, а мутацию по гену *сrn60-1* получить не удается, это будет означать, что существует специфичность действия шаперонинов в зависимости от их аминокислотной последовательности.

В. М. Єрко, П. А. Ланд

Ген *сrn60-1*, який кодує один з гомологічних шаперонінів у *Rhizobium leguminosarum*, є важливим для життєдіяльності клітини

Резюме

З використанням методу сайт-специфічного мутагенезу зроблено спробу побудувати нок-аут мутацію одного з трьох гомологічних генів для синтезу шаперонінів у *R. leguminosarum* *bv. viceae*. Показано, що ген *сrn60-1* не може бути «виведений з ладу» у зв'язку з його важливістю для життєдіяльності клітини.

V. N. Yerko, P. A. Lund

Gene *сrn60-1* coding one of homologous chaperonins in *Rhizobium leguminosarum* is essential for cell life

Summary

Using the method of site specific mutagenesis we have tried to knock-out one of three homologous genes for chaperonins synthesis in *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae*. It has been shown that *сrn60-1* gene cannot be destroyed due to its essentiality for cell life.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anfinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains // Science.—1973.—181.—P. 223—230.
2. Ellis R. J. Proteins as molecular chaperones // Nature.—1987.—328.—P. 378—379.
3. Zeilstra-Ryalls J., Fayet O., Georgopoulos C. The universally

- conserved GroE (Hsp60) chaperonins // Annu. Rev. Microbiol.—1991.—45.—P. 301—325.
4. Boorstain W. R., Zeigelhoffer T., Craig E. A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family // J. Mol. Evol.—1994.—38.—P. 1—17.
5. Fayet O., Zeigelhoffer T., Georgopoulos C. The groES and GroEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures // J. Bacteriol.—171, N 3.—P. 1379—1385.
6. Paek K.-H., Walker G. C. *Escherichia coli* dnaK null mutants are inviable at high temperature // J. Bacteriol.—1987.—169, N 1.—P. 283—290.
7. Rusanganva E., Gupta R. S. Cloning and characterization of multiple groEL chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti* // Gene.—1993.—126.—P. 67—75.
8. Babst M., Hennecke H., Fischer H.-M. Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* // Mol. Microbiol.—1996.—19, N 4.—P. 827—839.
9. Wallington E. J., Lund P. A. *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (сrn60) genes // Microbiology.—1994.—140.—P. 113—122.
10. Ogawa J., Long S. R. The *Rhizobium meliloti* groELc locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD // Genes and Development.—1995.—9.—P. 714—729.
11. Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria // Bio/Technology.—1983.—1.—P. 784—791.
12. Quandt J., Hynes M. F. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria // Gene.—1993.—127.—P. 15—21.
13. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—545 p.
14. Beringer J. E., Beynon J. L., Buchanan-Wollaston A. V., Johnston A. W. B. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium* // Nature.—1978.—276.—P. 633—634.
15. Генетические методы селекции клубеньковых бактерий (методические рекомендации).—Л.: ВНИИСХМ, 1984.
16. Ausubel F. M. Current Protocols in Molecular Biology.—New York: Willey Intersci., 1987.—320 p.
17. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.—1979.—7.—P. 1513—1523.

УДК 575.24:576.851.155
Поступила в редакцию 17.06.98