



NEUE FASSUNG

Stellungnahme der ZKBS zur Mobilisierbarkeit des Plasmids pBR322 und dessen Derivaten

Die Frage der Mobilisierbarkeit des Vektorplasmids pBR322 war insbesondere nach Veröffentlichung eines Artikels in der Schriftenreihe des Fonds der Chemischen Industrie (Seite 29, Heft 32, 1993) neu erörtert worden. In diesem Artikel wurde die Transferfrequenz von pBR322 aus einem *E. coli* K12 F⁺-Stamm als Donor in einen *E. coli* K12 F⁻-Stamm als Rezipient ohne Komplementation der Mobilisierungsgene mit etwa 1 angegeben.

Inzwischen stellte sich heraus, daß die dieser Veröffentlichung zugrundeliegenden Experimente auf einem fehlerhaften Ansatz beruhen und ihre Interpretation daher falsch war; sie wurden seitens der Autoren zurückgezogen. Die ZKBS möchte diesen Fall zum Anlaß nehmen, sich generell zur Mobilisierbarkeit von pBR322 und seinen Derivaten zu äußern.

Das Plasmid pBR322 besteht aus drei Segmenten: dem Tetrazyklinresistenz-Gen des Plasmids pSC101, dem Ampicillinresistenz-Gen des Transposons Tn3 und der Replikationsregion sowie benachbarten Sequenzen des *E. coli* Plasmids pMB1. Alle DNA-Segmente, aus denen pBR322 zusammengesetzt ist, wurden zuerst aus *E. coli* isoliert.

pSC101 entstand nach Scherung des Resistenzfaktors R6 und anschließender Transformation von *E. coli* (Cohen, S. N. et al., PNAS 70, 3240-3244; 1973). R6 wurde ursprünglich aus mehrfach resistenten *E. coli* O₄ isoliert, die aus einem mit *Salmonella typhimurium* infizierten Säugling stammten (Lebek, G., Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I Org. 188, 494-505; 1963).

Tn3 wurde als erstes transponierbares Element mit einer Antibiotikaresistenz (Amp^R) beschrieben (Hedges, R. W. and Jacob, A. F.; Mol. Gen. Genet. 132, 31-40; 1974).

pMB1 fällt in dieselbe Kompatibilitätsgruppe wie das Plasmid ColE1 und zeigt extensive Homologien zu ColE1. Der Replikationsursprung der Plasmide pMB1 und ColE1 ist bis auf eine 2 Basenpaare lange Inversion identisch. ColE1 ist ein kleines, natürlich vorkommendes, Colicin E1 produzierendes, nicht-konjugatives Plasmid mit relativ hoher Kopienzahl und engem Wirtsbereich, der sich auf *E. coli* und verwandte Organismen beschränkt (Current Topics Microbiol. Immunol. 83, 93-156; 1978).

pBR322 fehlen die Mobilisierungsgene (*mob*⁻), aber die sogenannte *bom*-Sequenz (*basis of mobility*), eine Erkennungsstelle für die Mobilisierungsproteine, und die *nic*-Sequenz, an der ein Einzelstrangsnchnitt vor dem Transfer bzw. der Mobilisierung erfolgt, sind in pBR322 noch vorhanden.

Mithin kann durch Komplementation mit Mobilisierungsgenen von gleichen oder eng verwandten Plasmiden eine Mobilisierung von pBR322 oder dessen Hybridderivaten erfolgen, jedoch nur bei Anwesenheit eines vollständigen Satzes von Transfergenen in der gleichen Zelle. Eine Mobilisierung durch z.B. den F-Faktor (konjugationskompetent) ist daher nur bei Anwesenheit eines dritten Plasmids (mobilisierungskompetent) möglich.

Die Aufdeckung dieser gentechnischen Zusammenhänge hat seit 1978 zur Deletion der entsprechenden DNA-Abschnitte von der pBR322 DNA geführt: pBR327, pBR328, pAT153, pUC Derivate usw., deren genetische Konstitution seither weit überwiegend allen gebräuchlichen Standard-Plasmidvektoren zugrunde liegt.



Eine weitere Möglichkeit der Mobilisierung kann durch Integration des Plasmids pBR322 und seiner Derivate in den F-Faktor mit Hilfe von IS-Elementen oder Transposons erfolgen. Die Häufigkeit solcher Kointegratbildung ist jedoch gering.

Literatur zur Mobilisierung von pBR322

- Bolivar, F. et al.; *Gene* 2, 95-113 (1977)
Cavarrubias, L. et al.; *Gene* 13, 25-35 (1981)
Finnegan, J. and Sherratt, D.; *Mol. Gen. Genet.* 185, 344-351 (1982)
Gealt, M. A. et al.; *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 836-841 (1985)
Kilbane, J. J. and Malamy, M. H.; *J. Mol. Biol.* 143, 73-93 (1980)
Mieschendahl, M. et al.; *Zbl. Hyg.* 193, 481-493 (1993)
Sandt, C.H. and Herson, D.S.; *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 194-200 (1991)
Twigg, A.J. and Sherratt, D.; *Nature* 283, 216-218 (1980)
Yong, I.G. und Poulis, M.I.; *Gene* 4, 175-179 (1978)