



УДК 577.143:547.963.3.54.05:578.233.7:578.815.1:579.252.5

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК  
НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ И НИТЧАТОГО БАКТЕРИОФАГА\*

Титеева Г. Р., Берлин Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

В ходе изучения рекомбинантных ДНК, объединяющих разнородные репликоны, получена фазмида из ДНК нитчатого фага M13mp2 (RF) и плазмиды pUR222 (Ap<sup>R</sup>), содержащих проксимальный участок лактозного оперона, путем рекомбинации *in vitro* по *EcoRI*-сайту в составе этого участка. Выделенная рекомбинантная ДНК передает устойчивость к ампициллину и, по данным гель-электрофореза, структурно-специфического взаимодействия с красителем, рестриктоного анализа, структурного анализа по Сэнгеру и электронной микроскопии, является линейной двухцепочечной молекулой, объединяющей фаговый и плазмидный геномы в эквимольном соотношении. Обе исходные ДНК в составе гибрида ориентированы таким образом, что основная часть фрагмента гена *lacZ* и регуляторные участки лактозного оперона разобщены; кольцо гибрида размкнуто вблизи плазмидного сайта *ori*. Бактериальные культуры, полученные при трансформации гибридной ДНК F<sup>+</sup>- и F<sup>-</sup>-хозяев, содержали во внеклеточной среде нуклеопротеид, из которого после осаждения и депротенизации выделили ту же гибридную ДНК. Таким образом, эта линейная двухцепочечная ДНК не только способна одеваться в белковую оболочку с образованием фагоподобной частицы (по диаметру близкой к фагу M13), но и выходить из клетки, причем не только из F<sup>+</sup>, но и из F<sup>-</sup>. С этими свойствами может быть связан один из путей межклеточного обмена генетическим материалом.

Векторы на основе одноцепочечных ДНК-содержащих бактериофагов получили широкое распространение в работах по клонированию и структурно-функциональному исследованию природных и искусственных ДНК [2–6]. Мы изучали рекомбинанты *in vitro*, содержащие производные бактериофага M13 и колициногенных плазмид (ранее были описаны подобные рекомбинанты *in vivo* [7–9]), с тем чтобы оценить векторную емкость фага и выяснить некоторые свойства ДНК с двумя различными репликонами. В одном из сочетаний были использованы ДНК фага M13mp2 [10] и плазмиды pUR222 [11]. Обе эти ДНК содержат идентичную нуклеотидную последовательность длиной около 800 п. о., включающую фрагмент лактозного оперона — дистальный конец гена *lacI*, регуляторные последовательности *lac po* и участок гена *lacZ*, кодирующий 145 N-концевых аминокислотных остатков β-галактозидазы. Наличие этого фрагмента делает возможной α-комплементацию, восстанавливающую функцию гена *lacZ* в бактериальных штаммах, дефектных по N-концу этого гена. В то же время бактериальная вставка в обеих ДНК содержит единственный *EcoRI*-сайт в составе кодонов 4–6 гена *lacZ*, причем встраивание полинуклеотида по этому сайту снимает эффект α-комплементации. Это свойство лежит в основе селекции рекомбинантов при использовании в качестве вектора фагов группы M13mp и плазмид pUR222 и ее аналогов.

Для получения рекомбинанта линейные формы ДНК M13mp2 и pUR222, образовавшиеся из двухцепочечных кольцевых ДНК при действии рестриктазы *EcoRI*, обработали ДНК-лигазой, полученной смесью трансформировали культуру *E. coli* BMH71-18 (F<sup>+</sup>) и выселили на твердую среду, содержащую Xgal и IPTG. Большая часть образовавшихся бляшек была окрашена в синий цвет, что характерно для исходных

\* Некоторые результаты настоящей работы доложены ранее [1]. Использованы сокращения: Xgal — 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид, IPTG — изопропилтно-β-D-галактопиранозид.

ДНК, и лишь ~2% оказались бесцветными. Эти бляшки содержат гибридную ДНК, поскольку они образуются на среде с ампициллином (т. е. включают рUR222, передающую устойчивость к этому антибиотику), а содержащаяся в них ДНК обладает значительно меньшей электрофоретической подвижностью, чем ДНК M13mp2. Наличие фаговой составляющей в полученном гибриде было подтверждено структурным анализом по Сэнгеру [12] с использованием в качестве праймера синтетического олигонуклеотида dACGAATGGATCCTC, комплементарного этой ДНК в районе *Bam*HI-сайта.

Предполагая образование бактериофага, содержащего одноцепочечную гибридную ДНК, мы использовали для выделения этой ДНК стандартную последовательность операций: отделение бактериальных клеток низкоскоростным центрифугированием, осаждение нуклеопротеида из супернатанта полиэтиленгликолем и депротеинизацию. В результате была получена индивидуальная ДНК, которую анализировали электрофорезом в агарозном геле, применяя для индикации акридинной оранжевой. Оказалось, что выделенной ДНК свойственна не красная флуоресценция (как следовало ожидать для одноцепочечной ДНК), а зеленая, характерная для двухцепочечных ДНК [13]; упоминавшийся выше структурный анализ гибридной ДНК по Сэнгеру не противоречит ее двухцепочечности, поскольку олигонуклеотидные праймеры способны к матрично-зависимой элонгации под действием ДНК-полимеразы в системе с денатурированной двухцепочечной ДНК [14]. В пользу двухцепочечности гибридной ДНК свидетельствует также то, что она расщепляется рядом рестриктаз. Так, при действии *Eco*RI образуются два фрагмента, совпадающие по подвижности с линейными формами исходных ДНК: M13mp2 (RF) и рUR222 (рис. 1).

В составе гибрида эти ДНК могут быть ориентированы двумя способами — с возникновением обратных или прямых повторов (см. рис. 2). Отсутствию β-галактозидазной активности (т. е. бесцветной культуре в присутствии Xgal) должна отвечать первая из этих структур (а), в которой основная часть фрагмента гена *lacZ* и регуляторные участки лактозного оперона разобщены. Данные электронной микроскопии (рис. 3) показали, что гибридная ДНК действительно является двухцепочечной и по размерам соответствует сумме исходных ДНК M13mp2 и рUR222. Однако при этом оказалось, что она представляет собой не кольцевую, а линейную молекулу. О ее структуре можно судить по результатам гидролиза эндонуклеазами рестрикции (положение рестриктных сайтов отмечено на рис. 2). Так, *Pst*I, как и *Eco*RI, расщепляет ее с образованием двух фрагментов, отвечающих по длине исходным линейным ДНК, а *Bam*HI приводит к фрагменту более короткому, чем фаговая ДНК, и еще одному фрагменту (возможно, смеси двух одинаковых по длине), близкому по величине к ДНК рUR222. Эти данные свидетельствуют о том, что кольцо гибридной ДНК разомкнуто вблизи плазмидного сайта *ori*.

Этой ДНК мы трансформировали две бактериальные культуры, различающиеся в основном наличием и отсутствием F-фактора. После ферментации и отделения клеток центрифугированием супернатанты были обработаны, как при выделении ДНК витчатых фагов [15], а клетки (осадок) — как при выделении плазмидной ДНК [16]. В результате осаждения полиэтиленгликолем и депротеинизации из супернатанта фагового



Рис. 1. Электрофорез ДНК в 1% агарозном геле: 1 — рUR222 (кольцевая), 2 — то же после расщепления *Eco*RI (линейная), 3 — M13mp2 (RF), 4 — то же после расщепления *Eco*RI (линейная), 5 — рекомбинантная ДНК (фагида) M13mp2-рUR222 (двухцепочечная линейная; из F<sup>+</sup>-культуры), 6 — то же после расщепления *Eco*RI

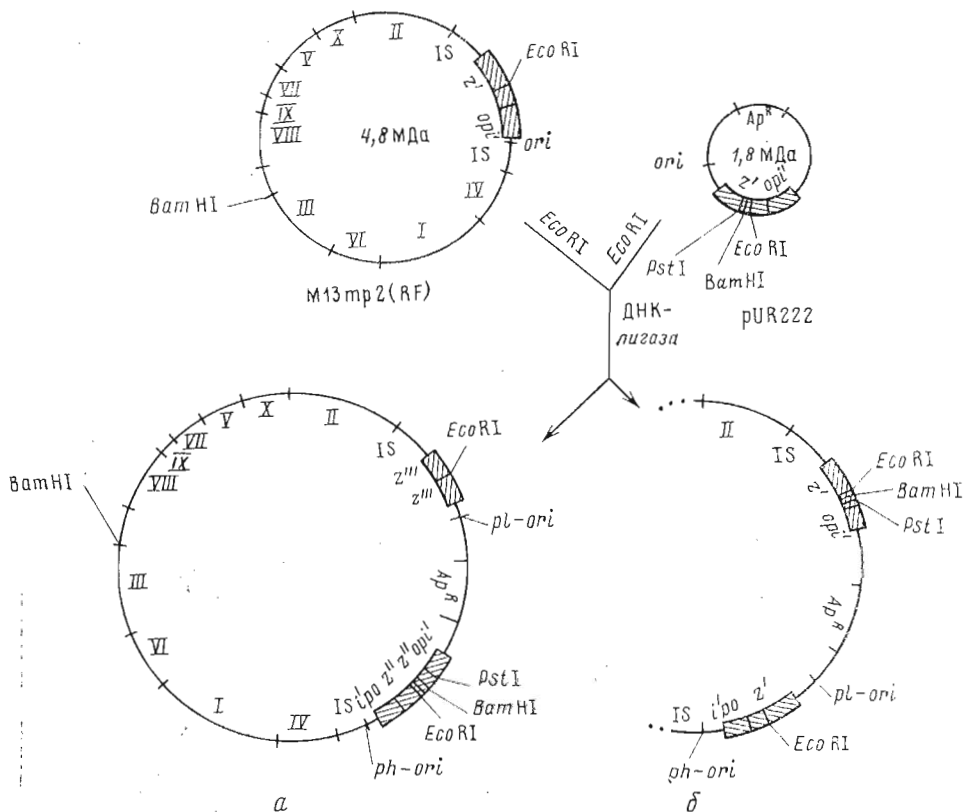


Рис. 2. Схема получения фазмиды M13mp2-pUR222: I-X и IS — гены и межгенный участок фага M13mp2; заштрихованный сегмент — фрагмент лактозного оперона:  $i'$  и  $z'$  — дистальный участок гена *lacI* и проксимальный участок гена *lacZ* в составе бактериальной вставки, *op* — участок оператора и промотора,  $z''$ ,  $z'''$  — участки гена *lacZ*, образовавшиеся при расщеплении участка  $z'$  рестриктазой *EcoRI*; а и б — кольцевые структуры рекомбинантных ДНК (M13mp2-pUR222), различающихся взаимной ориентацией компонентов и соответственно неспособных и способных к  $\alpha$ -комплементации (выделенная в настоящей работе линейная ДНК отвечает структуре а с разрывом вблизи *pl-ori*); *ph-ori* и *pl-ori* — участки начала репликации соответственно фаговой и плазмидной ДНК

хозяина ( $F^+$ ) выделили смесь двухцепочечной гибридной ДНК и одноцепочечной ДНК M13mp2 с преобладанием последней, а из супернатанта хозяина плазмиды ( $F^-$ ) — почти индивидуальный двухцепочечный рекомбинант с незначительной примесью pUR222. С помощью метода щелочной денатурации [16] было показано, что клетки обоих хозяев содержат ДНК pUR222; в то же время сопоставимые количества фаговой ДНК (RF-формы) были обнаружены лишь в клетках фагового хозяина, тогда как в клетках хозяина плазмиды этой ДНК почти не оказалось.

По УФ-спектральным характеристикам (см. рис. 4) нуклеопротеид, из которого была выделена гибридная ДНК, сходен с фагом M13mp2: мы получили соответственно величины 1,18 и 1,09 для  $A_{260}/A_{280}$ , а также 5,6 и 4,5% для весовой доли ДНК в комплексе. Эти данные свидетельствуют о том, что полученный нами нуклеопротеид в структурном отношении довольно близок к исходному бактериофагу. Действительно, электронная микроскопия нуклеопротеида (рис. 5) продемонстрировала типичную для нитчатого фага структуру толщиной  $\sim 75$  Å. Таким образом, полученная нами двухцепочечная фазмидная ДНК, подобно одноцепочечной фаговой ДНК, способна одеваться в белковую оболочку с образованием фагоподобной частицы и выходить из клетки, причем не только у  $F^+$ , но и у  $F^-$ -хозяина. Можно предположить, что линейность этой ДНК служит необходимой структурной предпосылкой самой возможности ее упаковки с образованием фагоподобной частицы и последующего выхода за пределы клетки. Линейность полученного нами ре-

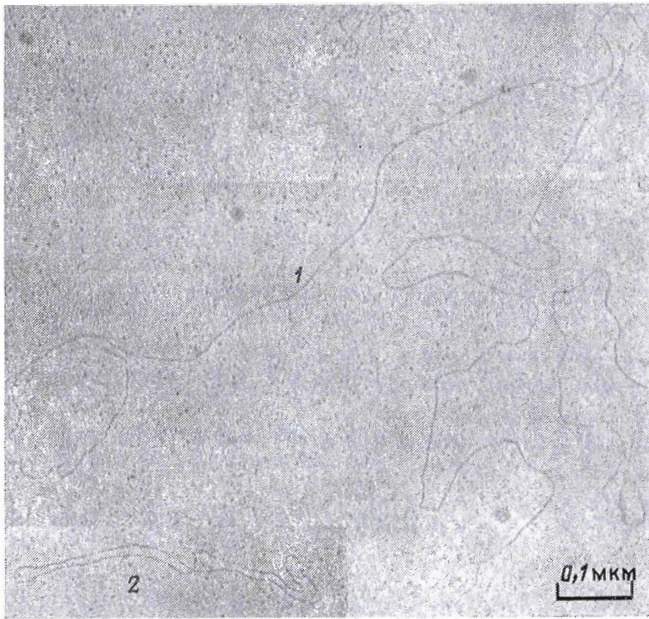


Рис. 3. Электронная микрофотография рекомбинантной ДНК: 1 — линейная двухцепочечная ДНК гибрида M13mp2-pUR222, 2 — кольцевая двухцепочечная ДНК димера pBR322 (стандарт)

комбинанта может быть обусловлена тем, что после трансформации кольцевой гибридной ДНК ее репликация в бактериальной клетке не завершается циклизацией (например, вследствие прочной ассоциации с каким-либо белковым фактором) или же внесением специфического разрыва в образовавшуюся кольцевую молекулу (ср., например, расщепление фаговой RF1-ДНК продуктом гена П [18]). Менее вероятным представляется то, что лигазная сшивка проходит только по одной паре *EcoRI*-сайтов исходных ДНК, так что последующая трансформация и репликация протекают при участии линейной гибридной ДНК.

Наряду с двухцепочечной гибридной ДНК во внеклеточной среде плазмидного (т. е. F<sup>-</sup>) хозяина оказывается исходная плазмидная ДНК; возможно, она также выходит из клетки в виде нуклеопротеида. Исходная плазида может оказаться в клетке (а затем и вне ее) в результате совместной с гибридом трансформации или же вследствие декомбинации гибрида в клетке; аналогичное рассуждение возможно в отношении фаговой (M13mp2) ДНК в случае F<sup>+</sup>-клеток. При совместной трансформации следовало ожидать, что голубая окраска колоний возникнет с самого начала, точнее, с того момента, когда фенотипическое проявление станет возможным. В действительности же бесцветные колонии, о которых шла речь выше, становятся голубыми лишь по истечении нескольких дней. Это свидетельствует в пользу декомбинации, которая более вероятна, чем совместная трансформация, также с учетом обычных представлений о несовместимости плазмид с одинаковыми репликационными.

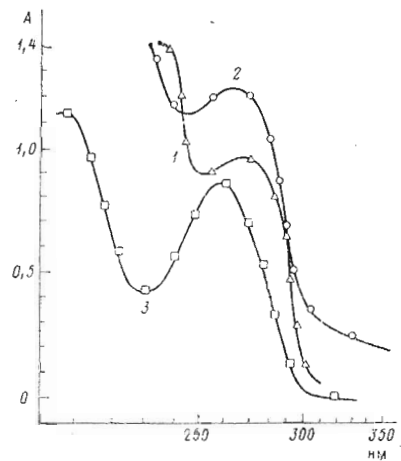


Рис. 4. УФ-спектры бактериофага M13mp2 (1), нуклеопротеида, содержащего гибридную (фазмидную) ДНК (2), и гибридной ДНК (3)

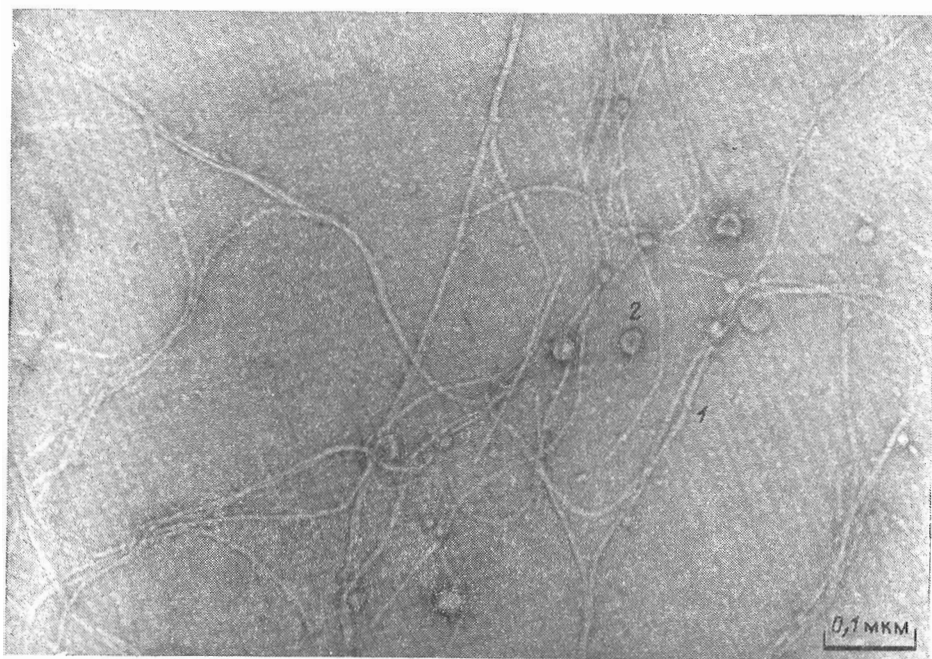


Рис. 5. Электронная микрофотография гибридного нуклеопротеида: 1 — нормальная шитчатая упаковка, 2 — сфероид (см., например, [17])

в супернатанте  $F^-$ -клеток гибридная ДНК значительно преобладает, тогда как в супернатанте  $F^+$ -клеток (после повторной трансформации) ее меньше, чем фаговой ДНК. Это означает, что устойчивость гибридной ДНК в  $F^-$ -клетках заметно выше, по-видимому, вследствие того, что эти клетки в отличие от клеток  $F^+$  дефектны по системе *recA*.

Одно из наблюдавшихся нами различий между  $F^+$  и  $F^-$ -клетками состоит в том, что внеклеточная среда  $F^+$ -клеток, как уже упоминалось, содержит в виде нуклеопротеида значительное количество одноцепочечной ДНК M13mp2. По-видимому, в клетках  $F^+$  наряду с гибридной ДНК одевается в белковую оболочку и выходит наружу нормальная одноцепочечная фаговая ДНК. В клетках же  $F^-$  условия для образования фаговой ДНК оказываются неблагоприятными, поэтому из клетки в виде нуклеопротеида выходит только двухцепочечная гибридная ДНК.

Способность ДНК выходить в среду без повреждения клетки, а затем поглощаться другими клетками была описана для многих бактерий и высших организмов [19–26]. Остается неясным, сопутствует ли это лишь патологическим явлениям (например, старению культуры у бактерий или неопластическим образованиям у млекопитающих) или же происходит также в случае нормальных клеток как один из путей генетического обмена. В ходе настоящей работы мы наблюдали выход из клетки фазмидной ДНК в составе комплекса с белком, о чем свидетельствуют приведенные выше данные УФ-спектроскопии и электронной микроскопии этих частиц. Известно, что при созревании нитчатых фагов комплекс одноцепочечной фаговой ДНК с белком гена V транспортируется к мембране, где происходит одевание в белковую оболочку с последующей секрецией вириона [17, 27]. Для одевания бывает достаточно наличия в гибридной ДНК относительно небольшого фрагмента фагового генома [28–30]. Наши данные об образовании нитчатых фагоподобных частиц не только одноцепочечной, но и двухцепочечной ДНК также свидетельствуют о том, что формирование белковой оболочки не строго специфично. Недавно была обнаружена способность белка гена V образовывать комплексы не только с одноцепочечными, но и с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами [31]. В связи с этим представляется вероятным, что превращение рекомбинантной ДНК M13mp2-pUR222 в

пуклеопротейд происходит аналогично образованию зрелой фаговой частицы из одноцепочечной ДНК, причем на первом этапе этого превращения двухцепочечная ДНК также образует комплекс с белком гена V.

Полученные результаты позволяют предположить, что образование в природных условиях такого рода рекомбинантов, способных к межклеточной миграции, может быть одной из причин быстрой приспособляемости клеток к внешним условиям, в частности возникновения устойчивости к лекарственным препаратам.

### Экспериментальная часть

В работе использовали дрожжевой экстракт, триптон и агар фирмы Difco, агарозу (Bio Rad),  $MgCl_2$ , дитиотреит, IPTG, Xgal, полиэтиленгликоль 6000, EDTA (Serva), трис (Merck), остальные реактивы отечественного производства (ос.ч. или перекристаллизованные). Эндонуклеаза рестрикции *EcoRI* и ДНК-лигаза фага T4 предоставлены А. А. Янулайтисом (НПО «Фермент», Вильнюс), культура фага M13mp2 и его хозяина, *E. coli* BMH71-18 [ $\Delta(lac, pro)\lambda/F'lacI^o lacZ\Delta M15pro$ ] [15], получены от Дж. Мессинга (Дэвис, Калифорния), культура *E. coli* K12 [ $F-lacZ\Delta M15recA$ ] (pUR222) [11] — от У. Рютера (Кёльн). Олигонуклеотид dACGAATGGATCCTC синтезирован фосфотриэфирным методом в растворе С. В. Виноградовым (ИБХ АН СССР, Москва).

Бактериофаги выращивали и бактериальные клетки в пробе культуральной жидкости лизировали как описано в работе [15], ДНК анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле. Гели окрашивали 0,03% раствором акридинового оранжевого в 10 мМ Na-фосфате, pH 7,0, отмывали тем же буфером и рассматривали в УФ-свете [13]. Фаговую ДНК выделяли по методу [15]. RF-форму фаговой ДНК и плазмидную ДНК выделяли методом щелочной денатурации [16]; после РНКазной обработки ДНК осаждали 10% полиэтиленгликолем 6000 [32], отделяли центрифугированием (30 мин, 10 000 g), осадок суспендировали в 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), 5 мМ EDTA, экстрагировали хлороформом и из водного слоя ДНК дважды переосаждали спиртом.

Для получения гибридной ДНК препараты ДНК pUR222 и M13mp2 (RF-форма) расщепляли рестриктазой *EcoRI* (2,5 ед. акт. на 1 мкг ДНК) в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl (pH 7,0), 80 мМ NaCl, 20 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ дитиотреит, в течение 1 ч при 37°С и фермент инактивировали нагреванием 2 мин при 100°С. Лигирование проводили в 20 мкл раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ АТФ, 20 ед. акт. T4 ДНК-лигазы (определение единицы активности см. [33]), 0,5 мкг линейной фаговой ДНК (RF) и 1 мкг линейной двухцепочечной ДНК pUR222 (ДНК вносили в реакционную смесь в виде соответствующих аликвот растворов после расщепления *EcoRI*), и инкубировали 16 ч при 12°С. Аликвоту лигазной реакции (соответствует 0,05 мкг исходной ДНК M13mp2) смешивали с 0,3 мл компетентных клеток [15], выдерживали 40 мин при 0°С, затем 2 мин при 45°С [15], при комнатной температуре прибавляли 40 мкл 0,25% водного раствора IPTG и 50 мкл 0,3% диметилформамидного раствора Xgal до конечной концентрации соответственно 25 и 40 мкг/мл. Далее прибавляли 0,2 мл ночной культуры *E. coli* BMH71-18 и 3 мл мягкого агара (45°С) и выливали на чашки с твердым YT-агаром. После 12 ч инкубации при 37°С индивидуальные бляшки выращивали на жидкой среде (2×YT) с ампициллином (200 мкг/мл). После центрифугирования выход гибридной ДНК из супернатанта (выделение см. [15]) составил 55 мкг/л.

В результате повторной трансформации *E. coli* BMH71-18 этой гибридной ДНК после аналогичной обработки была выделена смесь одноцепочечной фаговой и гибридной ДНК (400 мкг/л). Параллельно гибридной ДНК трансформировали клетки плазмидного хозяина ( $F^-$ ). После теплового шока и добавления IPTG и Xgal смесь высевали на YT-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл), а затем бесцветные колонии выра-

щивали на жидкой среде, как описано выше. При этом гибридная ДНК была выделена из супернатанта с выходом 70 мкг/л. Бактериальные клетки из этих двух опытов были обработаны по методу [16]; выход ДНК при этом составил соответственно 200 и 700 мкг/л.

Первичную структуру гибридной ДНК анализировали по Сэнгеру, как описано в работах [12, 14].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Титеева Г. Р., Берлин Ю. А. В сб.: Проблемы современной биохимии и биотехнологии. Рига, 1985, с. 198.
2. Messing J., Crea R., Seeburg P. H. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 2, p. 309-321.
3. Messing J., Vieira J. Gene, 1982, v. 19, № 2, p. 269-276.
4. Poncz M., Solowiejczyk D., Ballantine M., Schwartz E., Surrey S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 6, p. 4298-4302.
5. Kieny M. P., Laihe R., Lecocq J. P. Gene, 1983, v. 26, № 1, p. 91-99.
6. Artz S., Holzschu D., Blum P., Shund R. Gene, 1983, v. 26, № 2/3, p. 147-158.
7. Fischkoff D. A., Vovis G. F., Zinder N. D. J. Mol. Biol., 1980, v. 144, № 3, p. 247-265.
8. Dagert M., Jones I., Goze A., Romac S., Niandet B., Ehrlich S. D. EMBO J., 1984, v. 3, № 1, p. 81-86.
9. Dagert M., Ehrlich S. D. EMBO J., 1984, v. 3, № 1, p. 87-91.
10. Gronenborn B., Messing J. Nature, 1978, v. 272, № 5632, p. 375-377.
11. Rüther U., Koenen M., Otto K., Müller-Hill B. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 2, p. 4087-4098.
12. M13 Cloning/«Dideoxy» Sequencing Manual, 1980, BRL Inc.
13. McMaster G. K., Carmichael G. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 11, p. 4835-4838.
14. Guo Li-He, Yang R. C. A., Wu R. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 16, p. 5521-5540.
15. Messing J. In: Protocol for the application of the single-stranded DNA phage M13mp2 as a cloning vehicle, University of California at Davis, 1979, p. 1-21.
16. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513-1523.
17. Lopez J., Webster R. E. Virology, 1983, v. 127, № 1, p. 177-193.
18. Meyer T. F., Geider K., Kurz C., Schaller H. Nature, 1979, v. 278, № 5702, p. 365-368.
19. Ottolenghi E., Hotchkiss R. D. Science, 1960, v. 132, № 3435, p. 1257-1258.
20. Ottolenghi E., Hotchkiss R. D. J. Exp. Med., 1962, v. 116, № 4, p. 491-519.
21. Borenstein S., Ephrati-Elizur E. J. Mol. Biol., 1969, v. 45, № 2, p. 137-152.
22. Stroun M., Anker P. Mol. Gen. Genet., 1971, v. 113, № 1, p. 92-98.
23. Stroun M., Anker P., Gahan P., Rossier A., Greppin H. J. Bacteriol., 1971, v. 106, № 2, p. 634-639.
24. Stroun M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, v. 44, № 3, p. 571-578.
25. Anker P., Stroun M. Science, 1972, v. 178, № 4061, p. 621-623.
26. Федоров Н. С., Янева И. С. Усп. совр. биол., 1982, т. 93, № 2, с. 171-184.
27. Geider K., Baumel J., Meyer T. F. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 1, p. 6488-6495.
28. Aoyama A., Hayashi M. Nature, 1982, v. 297, № 5868, p. 704-706.
29. Van der Ende A., Teertsta R., Weisbeek P. J. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6849-6863.
30. Webster R. E., Grant K. A., Hamilton L. A. W. J. Mol. Biol., 1981, v. 152, № 4, p. 357-374.
31. Gray K. W., Page G. A., Gray D. M. J. Mol. Biol., 1984, v. 175, № 4/5, p. 553-559.
32. McMaster G. K., Samulski R. J., Stein J. L., Stein G. S. Anal. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 47-57.
33. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5045-5050.

Поступила в редакцию  
16.IX.1985

#### CONSTRUCTION AND PROPERTIES OF A FILAMENTOUS PHAGE-PLASMID HYBRID DNA

TITEEVA G. R., BERLIN Yu. A.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow

In the course of studying extrachromosomal DNA with composite replicons, a hybrid has been constructed by the in vitro recombination of the filamentous phage M13mp2 DNA (RF) and plasmid pUR222 (Ap<sup>R</sup>). Both parental DNAs contain a fragment of *lac*-operon (ca. 800 bp), which includes the distal end of *lacI* gene, *lacPO* segments, and the *lacZ* gene proximal region coding for 145 N-terminal amino acid resi-

dues of  $\beta$ -galactosidase and thus providing for  $\alpha$ -complementation, the effect being cancelled with a polynucleotide insertion at the unique *EcoRI* site in the *lacZ* gene segment. *E. coli* BMH71-18 cells were transformed with the ligated mixture of *EcoRI* restricts of both DNAs. A phage-like nucleoprotein was isolated from colourless plaques (on the Xgal- and IPTG-supplemented medium); its deproteinization yielded a DNA which contains the  $\text{Ap}^{\text{R}}$ -determinant and, according to PAGE, structurally specific staining, restriction analysis, sequencing by the Sanger procedure, and electron microscopy data, is a linear double-stranded molecule comprising the phage and plasmid genomes in an equimolar ratio. Since the hybrid DNA does not display the  $\alpha$ -complementation effect, both bacterial inserts are in the opposite orientation. Transformation of both phage (F<sup>+</sup>) and plasmid (F<sup>-</sup>) hosts with the hybrid DNA led to cultures which, after precipitation of the nucleoprotein from the extracellular medium and deproteinization, afforded the same composite DNA. Thus, the above hybrid linear double-stranded DNA, similarly to the circular single-stranded M13 DNA, can acquire a protein coat to form a filamentous phage-like particle (close in diameter, as electron microscopy shows, to phage M13), which leaves intact not only F<sup>+</sup> but also F<sup>-</sup> host cells. A way of the intercellular genetic exchange might be connected with these properties.