

带有 sop 基因稳定表达载体的构建

杜笑寒 丁久元 吴夏英 余志华 门大鹏

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 F质粒的第五个EcoRI片段 mini-F 具有质粒的分配功能。其 EcoRI-BamHI 片段含有 oriS、ccd、repD 和 sop 基因 (sopA, B 和 C)。该片段与 pBR322 重组, 得到质粒 pDMC32。pDMC32 经 SmaI 酶切, T4 连接酶连接, 得到衍生质粒 pDMC311, 消除了 oriS、ccd 和 repD 片段。MI32 (pDMC32) 和 MI311 (pDMC311), 在液体限磷基础培养基中培养 100 代, 质粒保持率分别为 93% 和 100%。而对照 MIR322 (pBR322) 培养 55 代时, 质粒保持率仅为 10%。带有色氨酸启动子质粒 pDR720 与 pBR322 重组, 得到质粒 pDMC40。pDMC40 再与 mini-F 的 sop 基因重组, 得到带有 sop 基因的稳定表达质粒 pDMC48。MI48 (pDMC48) 在液体限磷基础培养基中培养 100 代, 质粒保持率为 100%。

关键词 sop 基因, 质粒稳定性, mini-F, 稳定质粒

基因工程菌在无选择压力的培养过程中, 重组质粒都有不同程度的丢失, 即质粒的不稳定性⁽¹⁾, 从而影响到工程菌的表达水平。提高质粒稳定性的方法有多种, 其中比较有效和重要的方法, 是改造质粒的分子结构, 构建带有分配功能序列的稳定载体。质粒分配因子研究较深入的有质粒 pSC101 par 因子⁽²⁾、质粒 R1 parA 和 parB⁽³⁾、F 质粒 ccd、repD 和 sop 基因 (sopA、B 和 C)^(4,5)等。比较研究这些因子对质粒稳定作用强弱发现, 以质粒 R1 的 parB 和 F 质粒的 sop 基因稳定作用较好⁽⁶⁾。

F 质粒经 EcoRI 消化后的第 5 个片段, 又叫 mini-F (9.2kb)⁽⁷⁾, 在这个片段上有复制起始区 oriS 和 oriV; 质粒不相容性功能区 inc B、C、D、G 和 H; 与质粒稳定性有关的 ccd、repD 和 sop 基因。Yukawa⁽⁸⁾等构建了带有 mini-F 的载体, 克隆色氨酸合成酶基因 (trpAB), 质粒的保持率为 100%。鉴于 mini-F 对质粒起稳定作用的主要是 sop 基因片段⁽⁹⁾, 我们用 sop 基因片段构建了稳定质粒和稳定表达质粒, 并研究了它们的稳定性。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

本实验所用的大肠杆菌和质粒列于表 1。质粒 pFDW29 由复旦大学毛裕民教授惠赠。

培养基: LB 培养基⁽⁹⁾、基本培养基⁽¹⁰⁾、限磷基础培养基⁽¹¹⁾的配制, 均参照有关文献。胰蛋白胨和酵母粉为 Oxoid 公司产品。

1.1.1 质粒 DNA 的提取和纯化: 用快速碱法, DNA 的纯化用 CsCl 密度梯度离心法、PEG6000 沉淀法⁽¹²⁾。CsCl 为 Sigma 公司产品。

本文系“八·五”国家科学攻关项目。

北京大学生物系 91 届毕业生沈怀舜参加部分工作。

本文于 1994 年 8 月 8 日收到。

表 1 大肠杆菌菌株和质粒
Table 1 *E. coli* strains and plasmids

Strains and plasmids	Genotype	Source
<i>E. coli</i> strains		
C600	F ⁻ , thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ ⁻	This lab stock
MIR322	C600 (pBR322)	This work
MIR720	C600 (pDR720)	This work
MI311	C600 (pDMC311)	This work
MI32	C600 (pDMC32)	This work
MI40	C600 (pDMC40)	This work
MI48	C600 (pDMC48)	This work
Plasmids		
pBR322	Ap ^r , Tc ^r , ori [*]	This lab stock
pDR720	Ap ^r , ori, P _{trp} (trp promoter), galK	This lab stock
pFDW29	Ap ^r , sop, oriS, oriV, repD, ccd	Mao yumin <i>et al.</i> ⁽¹³⁾
pDMC32	Ar ^r , ori, sop, ccd, oriS	This work
pDMC311	Ap ^r , ori, sop, ccdA	This work
pDMC40	Ap ^r , ori, P _{trp}	This work
pDMC48	Ap ^r , ori, P _{trp} , sop	This work

* ori the pMB1 replicon.

1.1.2 质粒的重组与转化: 质粒 DNA 酶切和连接条件按公司推荐的条件进行。重组的 DNA 转化大肠杆菌 C600, 按文献 [12] 方法进行。DNA 片段的分离用透析袋法⁽¹⁴⁾及低熔点琼脂糖电泳⁽¹²⁾回收。转化子的筛选用培养基添加氨苄青霉素 (Amp) 100μg/ml, 或四环素 (Tet) 30μg/ml。限制性核酸酶和 T4 连接酶分别购自 Boehringer 公司、Promega 公司、BRL 公司和北京友谊公司。溴化乙锭 (EB) 购自 Sigma 公司, 琼脂糖购自 Promega 公司。

1.1.3 质粒稳定性的测定: 先将含有质粒的转化子接种于添加氨苄青霉素的 LB 培养基活化两次, 淘汰掉不含质粒的细胞。再以 10³/ml 的菌量分别接种到不加氨苄青霉素的 LB 培养基、基本培养基和限磷基础培养基中, 37℃ 培养, 当菌体增殖一定代数后, 重新以 10³/ml 菌量接种, 至总增殖 100 代为止。每次接种时, 以稀释的菌液涂布到不加氨苄青霉素的 LB 平板上。从生长的菌落中随机挑取 100~200 个菌落, 用灭菌牙签点种到加有氨苄青霉素的 LB 平板上。计算两种培养基上菌落数之比, 即为该转化子的质粒保持率。

1.1.4 氨苄青霉素最低抑制浓度 (MIC) 值的测定: 将含有质粒的大肠杆菌菌株在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中培养, 至 OD₆₀₀ 为 0.8, 各取 50μl 培养液接种到含有不同量氨苄青霉素的 3ml LB 培养基中, 于 37℃ 培养 8h, 测定菌株的生长情况。

1.1.5 质粒拷贝数变化的测定: 将大肠杆菌 MI48 接种于添加氨苄青霉素的 LB 培养基中活化两次, 淘汰掉不含质粒的细胞。以 10³/ml 的菌量接种到不加氨苄青霉素的限磷基础培养基中, 37℃ 培养, 每隔 24h 重新以 10³/ml 菌量接种至限磷基础培养基中, 至总增殖 100 代。同时, 每次取 0.1ml 该 24h 培养液涂布到含有不同量氨苄青霉素的 LB 平板上培养, 测定氨苄青霉素的 MIC。

2 实验结果

2.1 质粒 pDMC32 的构建

质粒 pFDW29 带有 mini-F 的 EcoR I -BamH I 片段⁽¹⁴⁾, 用 EcoR I 和 BamH I 分别

双酶切 pFDW29 和 pBR322, 琼脂糖凝胶电泳分别回收 mini-F 的 6.65kb 片段和 pBR322 的 3.99kb 片段。T4 连接酶连接回收 DNA 片段, 转化大肠杆菌 C600, 在加有氨苄青霉素的 LB 平板选择转化子, 再用加有氨苄青霉素和四环素的 LB 平板复筛。快速提取质粒 DNA, 琼脂糖凝胶电泳, 显示出介于 pBR322 和 pFDW29 之间的电泳带。该质粒定名为 pDMC32 (图 1)。对质粒 pDMC32 进行内切酶图谱分析, 结果如图版 I-A。试验结果与已知酶切图谱相同, 证明 pDMC32 是由 pBR322 和 pFDW29 的两个 EcoR I -BamH I 片段连接重组的, 分子量为 10.64kb。

2.2 质粒 pDMC311 的构建

为了构建仅带有 sop 基因片段的稳定质粒, 同时也缩小质粒的分子量。用 Sma I (与 Xma I 同功酶) 酶切 pDMC32, 消除或破坏了 oriS、repD 和 ccd 结构。琼脂糖凝胶电泳分离 8.69kbDNA 大片段, T4 连接酶连接, 大片段 DNA 自身环化。转化大肠杆菌 C600。在加有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选到 11 个转化子。快速提取质粒 DNA, 凝胶电

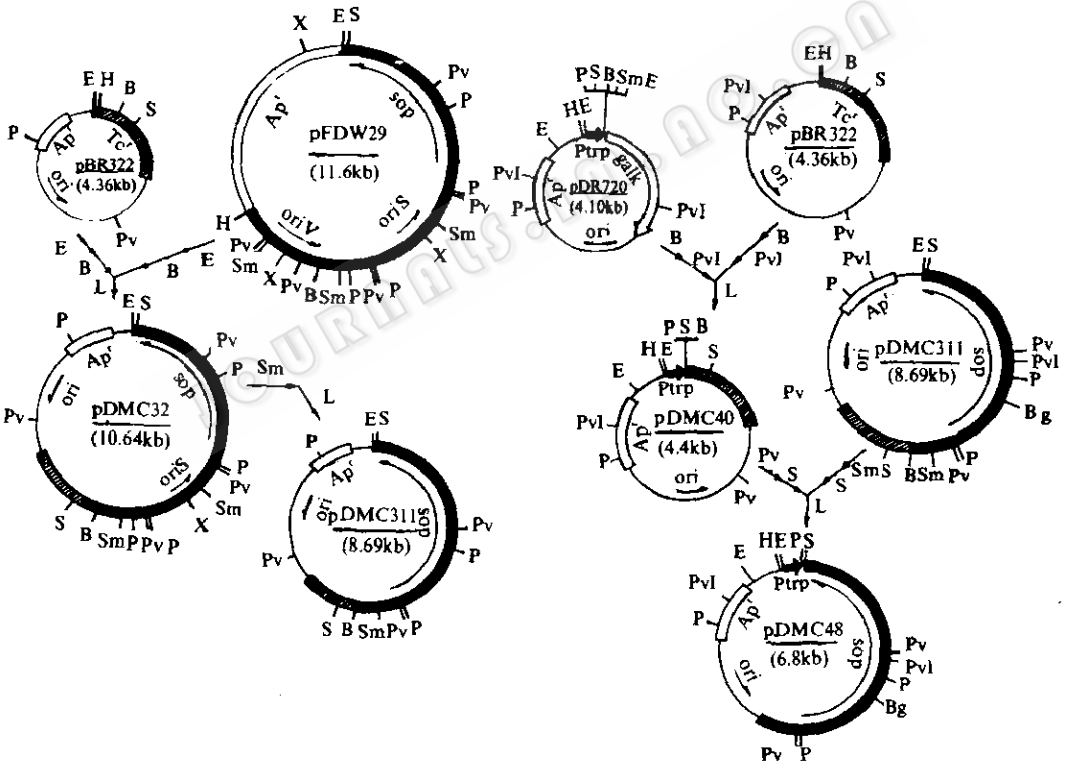


图 1 带有 sop 基因的重组质粒 pDMC311 和稳定表达载体 pDMC48 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids pDMC311 and the stable expression vector pDMC48 carrying sop genes.

B. BamH I, Bg. Bgl I, H. Hind II, E. EcoR I, P. Pst I, pv I. Pvu I, Pv. Pvu I, S. Sal I, X. Xho I, Sm. Sma I, L. T4 DNA ligase.

泳显示所有转化子都含有质粒。对质粒 DNA 进行内切酶图谱分析, 如图 1 和图版 I-B。结果与预期酶切图谱一致。该质粒定名为 pDMC311, 质粒 pDMC311 的分子量为 8.69kb。

2.3 质粒稳定性测定用培养基

质粒稳定性也受到培养条件的影响, 其影响中主要是能量的供应和核酸的合成。为了使质粒稳定性能够显示出差异, 对培养基与质粒稳定性关系进行了比较。

测定质粒稳定性之前, 先测定在不同培养基中增殖的代数。LB 培养基增殖 20 代为 9.5h, 基本培养基增殖 20 代为 12h, 限磷基础培养基 24h 增殖 13~17 代。因此, 在测定质粒稳定性时, LB 培养基和基本培养基每 20 代取样和重新接种, 限磷基础培养基为 24h。MIR322 (pBR322) 和 MI32 (pDM32) 的测定结果见图 2。用 LB 培养基和基本培养基培养, 质粒都很稳定。当用限磷基础培养基培养时, 质粒的稳定性则显示出差异。MIR322 (pBR322) 培养至 55 代时, 质粒的保持率降至 10%, 而 MI32 (pDMC32) 增殖至 100 代, 质粒保持率为 93%。所以后面有关质粒稳定性试验都使用限磷基础培养基。

2.4 质粒 pDMC32 和 pDMC311 稳定性的比较

MI32 (pDMC32) 和 MI311 (pMC311) 在限磷基础培养基中增殖 100 代, MI32 (pDMC32) 的稳定性为 93%, MI311 (pDMC311) 则为 100%, 实验结果表明, 在限磷条件下, sop 基因能够在 pMB1 复制子控制下, 对重组质粒起到很强的稳定作用, 不需要 F 质粒复制区 oriS 的存在, 也不需要 ccd 基因和 repD 基因的协助。

2.5 稳定表达质粒的构建

2.5.1 表达质粒 pDR720 的稳定性: 表达质粒 pDR720 带有色氨酸启动子 (Ptrp), 在改造前先进行稳定性测定, 以便和改造后的质粒进行比较。将 pDR720 转化 C600, 得到转化子 MIR720 (pDR720)。测定结果表明, MIR720 (pDR720) 在限磷基础培养基培养 100 代, 质粒保持率为 64%。

2.5.2 稳定表达质粒的构建: 由于质粒 pDR720 没有适合于 sop 基因片段插入的酶切位点, 第一步用质粒 pBR322 与 pDR720 进行重组, 同时消除 pDR720 上的 galK 基因, pBR322 经 BamH I 和 Pvu I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离 3.4kb 片段, pDR720 也用 BamH I 和 Pvu I 双酶切, 凝胶电泳分离 1.0kb 片段。混合这两个片段 DNA, T4 连接酶连接, 转化 C600。从 18 个转化子中复筛得到 13 个转化子。从中选出一株, 定名为 MI40 (pDMC40),

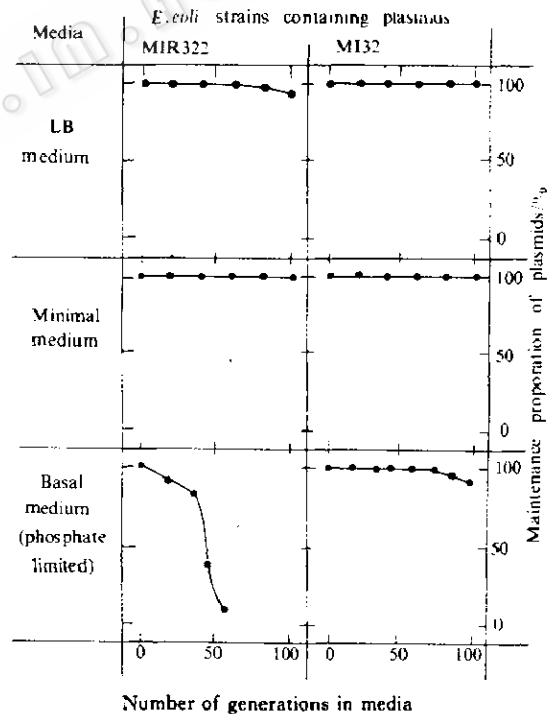


图 2 含有质粒菌株 MIR322 和 MI32 在不同液体培养基中培养时的质粒稳定性曲线
Fig. 2 Curves of plasmid stability of plasmid-containing strains MIR322 and MI32 in different liquid medium cultivation

酶切图谱分析见图 1 和图版 I-C。结果证明质粒 pDMC40 的酶切图谱与已知相同。质粒 pDMC40 的分子量为 4.4kb。

第二步是将 *sop* 基因与质粒 pDMC40 重组。pDMC40 经 Pvu I 和 Sal I 双酶切,电泳分离 2.7kb 片段。pDMC311 经 Sma I 和 Sal I 双酶切,电泳分离 4.1kb 片段。混合这两个片段, T4 连接酶连接,转化 C600。在加有氨苄青霉素的 LB 平板上生长了大量转化子。快速质粒提取, Hind III 酶切,确定了 11 株转化子。此衍生质粒定名为 pDMC48 (图 1)。

质粒 pDMC48 的酶切图谱见图版 I-D。实验证明 pDMC48 是由 *sop* 基因与 pDMC40 重组构建而成。其分子量为 6.8kb。

2.6 质粒 pDMC40 和 pDMC48 的稳定性

为了鉴定 *sop* 基因对 pDMC48 的稳定作用, MI48 (pDMC48) 在限磷基础培养基中培养 100 代, 质粒保持率为 100%。出乎意料的是 MI40 (pDMC40) 的质粒稳定性也为 100%。其机制可能与消除了质粒 pBR322 的四环素抗性基因的启动子区 (Hind III 位点) 有关。pBR322 的不稳定性主要是因为它没有自身分配机制, 也因为它带有的四环素抗性基因的启动子区 (Hind III 位点), 如果消除这一区域会明显提高质粒的稳定性^[15]。由图 3 可见, 质粒 pDMC40 除有 1kb 片段来自 pDR720 外, 其余部分均来自 pBR322, 并且 pBR322 的四环素抗性基因的启动子区 (Hind III 位点) 被去除了。作为质粒载体, pDMC40 虽然表现出很好的稳定性, 但当插入外源基因后, 是否仍然能够稳定遗传还有待于研究, 因为带有外源基因的重组质粒常在细胞分裂时表现出不稳定性。

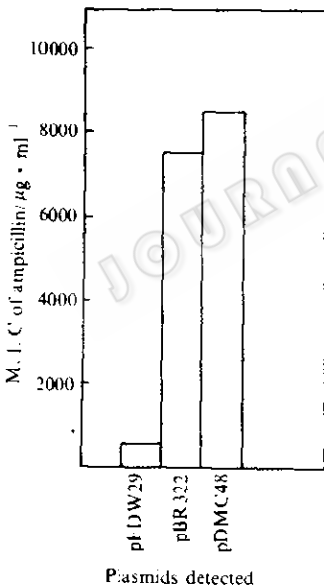


图 3 带有 *sop* 基因的重组质粒的拷贝数测定

Fig. 3 Schematic representation of the copy-number increase of recombinant plasmid carrying *sop* gene from F plasmid

The minimum inhibitory concentration (MIC) of ampicillin is copy-number related.

2.7 抗氨苄青霉素水平的测定

Uhlin^[16] 曾用抗生素抗性水平来估计质粒的拷贝数: MIC 值与接种浓度和培养条件有关, 但是在相同的条件下, MIC 值和质粒拷贝数成正比。我们在相同实验条件下用加有氨苄青霉素的 LB 培养基测定了 MI29 (pFDW29)、MIR322 (pBR322) 和 MI48 (pDMC48) 的最低抑制浓度 (MIC), 以相对比较它们的质粒拷贝数。测定结果如图 3 所示。pFDW29 与对照 pBR322 相比, 其拷贝数明显偏低。pDMC48 与 pBR322 相比, 前者的拷贝数稍高于后者。这两个质粒的拷贝数都明显高于 pFDW29。

质粒拷贝数是个平均数, 在细菌生长的不同阶段其拷贝数是不同的, 即周期性的动态变化。测定这种变化有助于了解它与宏观稳定性的关系, 以及质粒分配机制。用氨苄青霉素最低抑制浓度法测定了 MI48 (pDMC48) 在细胞生长不同阶段拷贝数的动

态变化, 结果如图 4。在培养的最初阶段, MIC 有一个明显的上升值, 然后呈现波形变化, MIC 值的总趋势是逐渐下降。但这种波动是在起始抗性水平以上波动, 即质粒拷贝数的变化是在其拷贝数基数线以上变化, 对质粒的稳定性并不产生影响, 也表现出质粒能在细胞分裂时分配到子细胞中。

3 讨 论

1975 年 Timmis^[17] 构建了含有 f5EcoR I 片段质粒 pSCB8, 显示出这一片段具有稳定质粒遗传的功能。Lovett^[18] 等确定了 mini-F 具有全部有关质粒稳定性的遗传信息。Ogura^[5] 等证明了具有稳定功能结构 DNA 位于 mini-F 的 C-A₂ 区, 即分配功能区, 而与复制区无关。因此, 把具有分配功能结构区命名为 sop 基因 (Stability of plasmid)。

F 质粒的分配基因 sop 是由三个功能区组成的。sopA 和 sopB 基因分别编码蛋白 A 和 B^[19], sopC 是 12 个以 43bp 为单位的重复序列^[20,21]。关于 sop 基因的分配机制, 1983 年 Ogura 等提出膜相关模型^[5]。sopC 基因是实际的分配特异位点。sopB 基因产物 B 蛋白可能是膜组分中的一种蛋白, 它与 sopC 结合, 起到稳定质粒分配功能。或者 B 蛋白与 sopC 结合, 催化 sopC 与细胞膜组分联接在一起, 在细胞分裂时使质粒稳定分配。而关于 sopA 基因产物 A 蛋白功能尚不明确。1985 年 Hayakawa 等^[22] 证明了 B 蛋白与 sopC 结合。Lane 等^[19] 证明了 sopC 可能起着丝点的功能。1987 年 Womble 等^[23] 指出, oriS 复制区的 repE 蛋白和两端重复序列区相互作用决定了 mini-F 的低拷贝遗传。1988 年 Yukawa^[10] 等提出了 mini-F (EcoR I - BamH I 片段) 对 pMB1 复制子的稳定机制模型。他们认为 mini-F 先负责把低拷贝数质粒分配到子细胞中, 然后 pBR322 复制子在子细胞中再进行高拷贝数复制。这一假设成立的前提是必须有 oriS 的存在。1990 年 Austin^[24] 等又提出质粒参与细胞分裂时, 同一不相容族质粒在宿主细胞中有着共同而数量有限的受体位点, 两个子质粒结合在同一个受体位点上。质粒通过修饰宿主的某种结构, 获得所需要的受体位点, 修饰蛋白即 sop 基因的产物。

Kass^[25]、Hogan 等^[26] 证明, mini-F DNA 通常不分布于细胞的两极。Novick 等^[27] 在研究金黄色葡萄球菌的高拷贝质粒与低拷贝质粒与细胞膜相互关系时发现, 原生质体再生为细胞, 分裂时高拷贝质粒丢失频率很高。而接近赤道板类核物质的低拷贝质粒丢失频率最低。

本文所构建的重组质粒 pDMC311 和 pDMC48, 虽然均只带有 sop 基因, 缺失了 repE 蛋白和 oriS 部分, 但却都使 pMB1 型复制子质粒得到高度稳定。这一结果是不能用 Yukawa 的假设解释的。综合上述, 我们假设本文构建的这些含 sop 基因的重组质粒是始

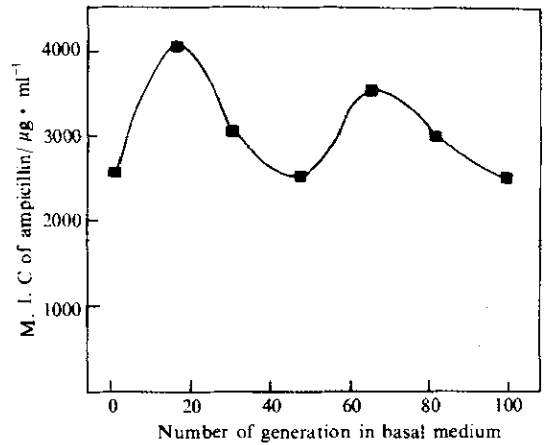


图 4 质粒 pDMC48 在培养过程中拷贝数的变化
Fig. 4 Schematic representation of the plasmid pDMC48 copy-number changes during prolonged cultivation
Plasmid copy-number is represented by MIC level of ampicillin

终以高拷贝复制、分配和遗传的。B 蛋白是细胞分裂时新生细胞膜的一种组分,也是 *sopC* 的受体位点。由于这些质粒的高拷贝复制, B 蛋白的量大大增加,也即质粒分配时的受体位点增加,高拷贝质粒都能通过 *sopC* 与 B 蛋白结合。细胞分裂时质粒正进行着活跃的复制,复制中的质粒集中于赤道板两侧,待子细胞的隔膜形成后,子质粒便被隔离在子细胞中。质粒在细胞分裂后与受体蛋白解离,这种调控功能可能是 A 蛋白的作用,然后质粒又重新循环新一轮的复制。

我们用 MIC 值间接测定了质粒的拷贝数变化。在我们所用实验条件下,氨基青霉素抗性基因表达不受影响, MIC 值与基因剂量成正比。关于 *sop* 基因与质粒拷贝数的关系,根据我们的实验结果分析,质粒 pDMC48 中 pMB1 复制区是独立地进行复制, *sop* 基因的功能在于使复制后的子质粒稳定地遗传。所以质粒拷贝数和质粒拷贝数周期性变化,都与 *sop* 基因无关。

与 pBR322 的稳定性相比时,带有 *sop* 基因的衍生质粒,即使在限磷基础培养基这样苛刻条件下,仍然表现出很高的质粒保持率。质粒 pDMC32、pDMC311 和稳定表达质粒 pDMC48,都具有作为遗传工程载体的潜在应用前景。质粒 pDMC48 改造后原来的人工接头酶切位点仅剩下一个,有待于再连接上一个多酶切位点新的人工接头。有关稳定质粒插入外源基因后稳定程度的研究,将另文报道。

致谢 陈琦研究员、黄和容研究员对本工作给予热情关心指导,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Primrose S B, Ehrlich S D. *Plasmid*, 1981, 6: 193~201.
- [2] Meacock P A, Cohen S N. *Cell*, 1980, 20: 529~542.
- [3] Gerdes K, Larsen J E L, Molin S. *J Bacteriol*, 1985, 161: 292~296.
- [4] Ogura T, Hirata S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 4784~4785.
- [5] Ogura T, Hirata S. *Cell*, 1983, 32: 351~360.
- [6] Boe L, Gerdes K, Molin S. *J Bacteriol*, 1987, 169: 4646~4650.
- [7] Mori H, Kondo A, Ohshima A *et al.* *J Mol Biol*, 1986, 192: 1~15.
- [8] Yukawa H, Kurusu Y, Shimazu M, *et al.* *J Indust Microbiol*, 1988, 2: 323~328.
- [9] Miller J H. *Experiment in Molecular Genetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
- [10] Yukawa H, Kurusu Y, Shimazu M *et al.* *Process Biochem.*, Dec. 1987, 165~168.
- [11] Jones I M Primrose S B, Robinson A *et al.* *Mol Gen Genet*, 1980, 180: 579~584.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition.*, Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- [13] 毛裕民, 盛祖嘉. *遗传学报*, 1990, 17 (6): 476~483.
- [14] Yang R C A, Lis J, Wu R. *Methods in Enzymology*, 1979, 68 (10): 177~182.
- [15] Kolot M N, Kashlev M V, Gragerov A I *et al.* *Gene*, 1989, 75: 335~339.
- [16] Uhlin B E, Nordström K. *Plasmid*, 1977, 1 (1): 1~7.
- [17] Timmis K, Cabello F, Cohen S N. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1975, 72: 2242~2246.
- [18] Lovett M A, Helinski D R. *J Bacteriol*. 1976, 127: 982~987.
- [19] Wehlmann H, Eichenlaub R. *Mol Gen Genet*, 1980, 180: 205~211.
- [20] Lane D, Rothenbuehler R, Merrilat A-M. *Mol Gen Genet*, 1987, 207: 406~412.
- [21] Hellsberg M, Eichenlaub R. *J Bacteriol*, 1986, 165: 1043~1045.
- [22] Hayakawa Y, Murotsu T, Matsubara K. *J Bacteriol*, 1985, 163: 349~354.

- [23] Womble D D, Rownd R H. *J Mol Biol*, 1987, **195**: 99~113.
- [24] Austin S, Nordström K. *Cell*, 1990, **60**: 351~354.
- [25] Kass L B, Yarmolinsky M B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, **66**: 815~822.
- [26] Hogan J E, Kline B C, Levy S B. *Plasmid*, 1982, **8**: 36~44.
- [27] Novick R, Sanchez-Rivas C, Gruss A *et al.* *Plasmid*, 1980, **3**: 348~358.

Construction of a Stable Expression Vector Carrying sop Genes

Du Xiaohan Ding Jiuyuan Wu Xiaying Yu Zhihua Men Dapeng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract The EcoR I -BamH I fragment of mini-F contains oriS, ccd, repD and sop genes (sopA, sopB and sopC). Recombinant plasmid pDMC32 was constructed from EcoR I -BamH I fragments of plasmid pBR322 and mini-F carried by plasmid pFDW29. The plasmid pDMC32 was treated with restriction enzyme Sma I, eliminating oriS, ccdB and repD, the larger fragment ligated itself with T4 DNA ligase. The resulting plasmid pDMC311 contains sop genes and ccdA gene. The *E. coli* strains MI32 harbouring plasmid pDMC32 and MI311 harbouring plasmid pDMC311 were cultivated in nonselective phosphate-limited basal medium for 100 generations respectively. The maintenance of the plasmids pDMC32 and pDMC311 were 93% and 100% respectively. As for the control plasmid pBR322, only 10% of plasmid maintenance was observed after 55 generations cultivation. In order to make a stable expression vector that carries sop genes, plasmid pDMC40 was constructed by adding a trp promoter from pDR720 to pBR322. The stable expression vector pDMC48 was then derived from pDMC40 by inserting sop genes into it from pDMC311. The maintenance proportion of plasmid pDMC48 in *E. coli* was still 100% after 100 generations continuous cultivation of cells harbouring the plasmid in phosphate-limited basal medium.

Key words sop genes, stability of plasmid, mini-F, stable plasmid