



УДК 547.963.32.04

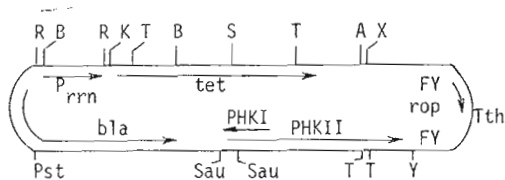
НОВЫЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ  
И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВГуревич А. И., Бабий Н. И., Некрасова О. В.,  
Черненко Е. А., Колосов М. Н.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

На основе плазмиды pRRN2 (производной pBR322) сконструирована серия многокопийных плазмид pMCR, в том числе с терминаторами транскрипции, встроенными за концом гена *tet*, а также с обратной по отношению к гену RNK1 ориентацией гена *tet*. В таких плазидах возможно клонирование генов с сильными промоторами для повышения уровня экспрессии.

Уровень экспрессии гена, клонированного в плазмидном векторе, определяется, в частности, копийностью плазмиды, регулирующей дозу гена, и эффективностью промотора и терминатора, регулирующих его транскрипцию. Поскольку репликация многих плазмид инициируется синтезом РНК-праймера, процесс транскрипции в областях, прилегающих к гену этой РНК, участвует в контроле репликации и копийности плазмид. Учитывая это, для достижения высокого уровня экспрессии клонируемых генов мы сконструировали серию плазмидных векторов, в которых, с одной стороны, благодаря делеции элементов структуры, непосредственно участвующих в контроле репликации, повышена копийность, а с другой стороны ослаблен контроль репликации, который может осуществляться в результате транскрипции генов, не принимающих прямого участия в образовании РНК-праймера (см. рисунок).

Мы исходили из плазмиды pRRN2, полученной нами ранее [1] в результате клонирования части промоторной области гена *rrnB* в *EcoRI*-сайте плазмиды pBR322mpt5 [2]. Среди элементов структуры, участвующих в контроле репликации pRRN2, как и других производных pBR322, можно отметить, наряду с геном RNK1 ген *rop* (белка-репрессора праймера репликации РНКII) [3] и сайт фактора репликации Y (FY) [4], изменение или делеция которых ослабляют контроль репликации и увеличивают копийность плазмид [5]. Эти элементы структуры расположены в участке, находящемся между сайтами рестриктаз *Tth111I* и *AvaI* или между двумя сайтами рестриктазы *TaqXI* (*EcoRII*). Поэтому для повышения копийности векторов мы делетировали в pRRN2 участок между *Tth111I*- и *AvaI*-сайтом. Концы большого *Tth/Ava*-фрагмента были затуплены с помощью ДНК-полимеразы А и сшиты с синтетическим самокомплементарным линкером dGGGAGATCTCCC, содержащим *BglII*-сайт. При этом в образовавшейся плазмиде pMCR1 (Multi Copying Replicon) восстанавливался *AvaI*-сайт.

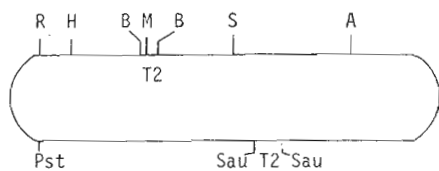
Если транскрипция гена *tet* в плазидах, родственных pBR322, начата в сильном промоторе, она недостаточно эффективно прекращается в соответствующем терминаторе плазмиды и в результате может снижать копийность плазмид и соответственно экспрессию клонированных генов [6, 7] (возможно, путем ингибирования синтеза РНКII, как в случае плазмиды ColEI [8]). В плазидах, описываемых в настоящем сообщении, ген *tet* транскрибируется с промоторов *rrnB*, которые с одной стороны, сами принадлежат к числу сильных [6, 9, 10], а с другой — являются «переносными», так как они находятся между двумя сайтами рестриктазы *EcoRI* и могут быть легко заменены (или дополнены) еще более эф-



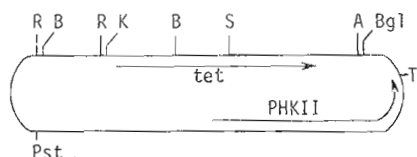
pRRN2: X = Y = T

pRRN2a: X = BglI, Y = T

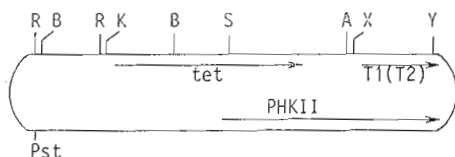
pRRN2b: X = T, Y = BglI



pBR322t2

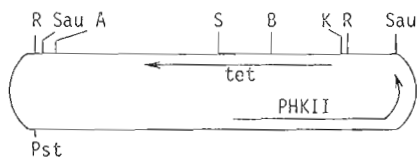


pMCR1

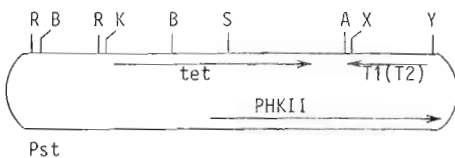


pMCR1t1a: T1; Y = BglI, X = SauI

pMCR1t2a: T2; X = Y = SauI



pMCR2



pMCR1t1b: T1; Y = SauI, X = BglI

pMCR1t2b: T2; X = Y = SauI

Структура плазмид серии pMCR. Указано положение сайтов рестриктаз (R — *EcoRI*, H — *HindIII*, B — *BamHI*, S — *SalI*, Pst — *PstI*, Tth — *Tth111I*, A — *AvaI*, Bgl — *BglII*, Sau — *Sau3A*, M — *MspI*, K — *KpnI*, T — *TaqXI*), генов *tet*, *bla*, PHKI и PHKII. Стрелками указано направление транскрипции генов, ориентация терминаторов в терминаторных фрагментах T1 и T2 и промотора P<sub>rrn</sub>

эффективными промоторами с сохранением целостности гена *tet*. Для ослабления влияния таких сильных промоторов на репликацию можно использовать дополнительные терминаторы. Так, встраивание в плазмиду терминатора фага fd приводит к обрыву транскрипции (*in vivo* — на 93%) даже с очень сильных промоторов фага T5 [11]. Следует отметить, что при конструировании вектора с терминатором фага fd авторам работы [11] удалось клонировать в плазмиде pBU3 (происходящей от pBR322) фрагмент *Sau3A*-336, содержащий терминатор, лишь в обратной ориентации. Для конструирования наших плазмидных векторов мы также использовали терминатор фага fd в рестриктном фрагменте *Sau3A*-336 (T1) и, кроме того, терминатор гена PHKI плазмиды pBR322 в рестриктном фрагменте *Sau3A*-76 (T2). Для получения последнего набор *Sau3A*-фрагментов pBR322 мы подвергали электрофорезу в 5% ПААГ и затем неразделенные фрагменты *Sau3A*-76 и *Sau3A*-79 клонировали в *BamHI*-сайте той же плазмиды pBR322. При этом оба конца фрагмента *Sau3A*-76 регенерировали *BamHI*-сайт, так что клонированный таким образом в плазмиде pBR322t2 терминатор T2 является «переносным» терминатором. Фрагмент *Sau3A*-336 легко отделяется от более крупных *Sau3A*-фрагментов

ДНК фага  $\lambda$ d при электрофорезе в 5% ПААГ. При лигазной сшивке этого фрагмента с вектором pMCR1 (предварительно расщепленным *Bgl*II и дефосфорилированным) были получены плазмиды pMCR1t1a и pMCR1t1b. Аналогично из pMCR1 и «переносного» терминатора T2 были получены плазмиды pMCR1t2a и pMCR1t2b. Реципиентом при клонировании гибридных плазмид служила *E. coli* HB101, селекцию трансформантов проводили по отсутствию гибридизации колоний с синтетическим додекануклеотидом. Ориентацию терминаторов в плаزمиде определяли рестриктивным анализом: в плазмиде pMCR1t1a и pMCR1t1b, где сайт *Bgl*II регенерирует лишь один из концов терминаторного фрагмента T1, — по величине *Eco*RI/*Bgl*II-фрагментов, а в плазмиде pMCR1t2a и pMCR1t2b — по величине *Ava*I/*Msp*I-фрагментов.

Другим способом преодолеть ингибирующее влияние транскрипции гена *tet* на репликацию могло быть изменение ориентации этого гена в плазмиде. С этой целью мы получили плазмиду pMCR2, в которой направление транскрипции гена *tet* совпадает с направлением транскрипции генов *bla* и праймера репликации РНКII, а не РНКI. Для этого исходная плазмиды pRRN2 была подвергнута частичному гидролизу рестриктазой *Taq*XI, концы образовавшихся линейных ДНК затуплены с помощью ДНК-полимеразы А и сшиты с упомянутым выше *Bgl*II-лигкером. При клонировании полученных плазмид были получены клоны, содержащие плазмиды pRRN2a и pRRN2b (сохранившие признак  $Tc^r$  и способность гибридизоваться с синтетическим додекануклеотидом). Смесь этих плазмид без разделения была гидролизована рестриктазой *Bgl*II, а затем частично — рестриктазой *Bam*HI, полученная смесь фрагментов подвергнута лигазной сшивке и клонированию. В результате трансформации были получены клоны, содержащие плазмиду pMCR2, строение которой подтверждено рестриктивным анализом (размерами *Eco*RI- и *Pst*I/*Bam*HI-фрагментов).

Таким образом, мы сконструировали серию плазмид двух типов, в которых путем делеции части репликаона ослаблен контроль репликации и устранено ингибирующее влияние транскрипции гена *tet* на репликацию. Это позволяет использовать область *tet* для клонирования генов с сильными промоторами.

### Экспериментальная часть

Реактивы: трис, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal); мочевины, ос.ч. (Reaxim); агароза, биогель НТР (Bio-Rad); LMP-агароза (BRL); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); поливинилпирролидон, фикокол (Serva); сахароза, бычий сывороточный альбумин, АТФ, dNTP (Sigma); суммарную дрожжевую РНК (Sigma) дополнительно очищали трехкратной фенольной экстракцией из трис-хлоридного буфера (рН 7,6) и дважды переосаждали спиртом; шитроцеллюлозные фильтры, диаметр пор 0,4 мкм (СЫНПОР 6, ЧССР); [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ и [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dNTP (1500–2000 Кб/ммоль) (Amersham).

Ферменты: T4-ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1) выделена из суперпродукта *E. coli* 1100 ( $\lambda$  989) по методу [12]; T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) выделена по методу [13]; ДНК-полимераза А (ДНК-полимераза I, фрагмент Кленова) (КФ 2.7.7.7) выделена из суперпродукта *E. coli* CJ155 по методу [14]; щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1) (НИКТИ БАН, г. Бердск); лизоцим (КФ 3.2.1.17) (Sigma). Рестрикционные эндонуклеазы (КФ 3.1.23.x): *Eco*RI и *Hae*III выделены, как описано в работе [15]; *Taq*XI выделена, как описано в работе [16]; *Tth*111I выделена из *Thermus thermophilus* 111 по методу [17] со следующими модификациями: после хроматографии на гепарин-агарозе содержащиеся фермент фракции хроматографировали на гидроксипатите в градиенте концентрации 0,001–1,0 М К-фосфата (рН 7,4) в 0,1 М NaCl; *Tth*111I элюировали при концентрации К-фосфата 0,62–0,72 М. *Ava*I выделена из *Anabaena variabilis* по методу [18], но при хроматографии на фосфоцеллюлозе Р-11 фракции, содержащие *Ava*I, элюировались 0,21–0,36 М NaCl. *Bgl*II выделена из

*Bacillus globulii* по методу [19] со следующими модификациями: после хроматографии на геарин-агарозе содержащие фермент фракции хроматографировали на DEAE-целлюлозе DE-52 в градиенте концентрации 0,05–0,4 М NaCl в буфере, содержащей 10 мМ трис-HCl, 0,5 мМ EDTA, 7 мМ 2-меркаптоэтанол (pH 7,5); *Bgl*II элюировали при 0,15 М NaCl. *Msp*I и *Sau*3A (Институт прикладной энзимологии, Вильнюс); *Bam*HI (отечественного производства) дополнительно очищали хроматографией на Bio-Rex 70 по методу [20].

5'-Концевую метку вводили по методу [21]; 3'-концевую метку в фрагменты с выступающими 5'-концами вводили по методу [22], а с тупыми концами — по методу [23]. Для секвенирования ДНК использовали частичную химическую деградацию твердофазным методом Чувпило и Кравченко [24]. Электрофорез проводили в пластинах ПААГ (5–15%) толщиной 0,4 мм в 50 мМ трис-боратном буфере (pH 8,3) или в 1% агарозном геле в буфере (pH 8,0), содержащем 40 мМ трис-ацетат, 20 мМ NaOAc, 20 мМ NaCl и 1 мМ EDTA. Радиоавтографы получали на рентгеновской пленке РМ-1, используя при низкой радиоактивности образцов усиливающие экраны ЭУ-В3. Выделение ДНК из гелей проводили методом вытеснительной электроэлюции [25] или экстракции из LMP-агарозы [26].

Сшивку с синтетическим самокомплементарным линкером проводили в буфере, содержащем 66 мМ трис-HCl, 7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 0,5 мМ АТР (pH 8,0) при 20° (20 ч), при концентрации T4-ДНК-лигазы 1 ед. акт./мкл, концентрации линейаризованной плазмиды 0,01 пмоль/мкл и 100-кратном избытке додекануклеотида. Встраивание клонируемых фрагментов в *Bgl*II и *Bam*HI-сайты плазмид проводили при 14–15° С (20 ч), концентрации T4-ДНК-лигазы 1 ед. акт./мкл, фрагмента 0,1 пмоль/мкл и плазмиды — 0,05 пмоль/мкл. Компетентные клетки *E. coli* HB101 готовили по методу [27] и хранили при –50°. После трансформации гибридными плазмидами в условиях работы [27] клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей 100 мкг/мл ампициллина или 20 мкг/мл тетрациклина.

Гибридизацию колоний на фильтрах проводили по видоизмененному методу [28]: нитроцеллюлозный фильтр с отпечатками колоний обрабатывали 0,5 М NaOH (2 раза по 15 мин на пропитанной этим раствором фильтровальной бумаге), затем нейтрализовали буфером 0,2 м трис-HCl, 1 М NaCl, pH 7,5 (2 раза по 15 мин) и высушивали в вакууме 2 ч при 80° С. Подготовленные фильтры инкубировали 1 ч при 65° в растворе 2×SSC (0,3 М NaCl, 0,33 М цитрат натрия), 0,02% бычьего сывороточного альбумина, 0,02% поливинилпирролидона и 0,02% фиколла, и затем проводили гибридизацию с <sup>32</sup>P-меченым додекануклеотидом (200 пмоль, 1000 Ки/ммоль) в растворе, содержащем 4×SSC, 1 мМ EDTA, 10 мМ трис-HCl (pH 7,5) в течение 18 ч при 34° С, дважды промывали 2×SSC (по 1 ч при 25° С), высушивали и радиоавтографировали.

Авторы выражают благодарность Г. М. Смирновой и В. Н. Позднякову за биомассу *Thermus thermophilus* и *Anabaena variabilis* и Н. М. Звонку за синтетический линкер.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гуревич А. Н., Аваков А. Э., Игошин А. В., Колосов М. Н. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 4, с. 557–560.
2. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Чувпило С. А., Северцова И. В., Шингарова Л. Н., Колосов М. Н. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 2, с. 309–312.
3. Cesarini G., Muesing M. A., Polisky B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 20, p. 6313–6317.
4. Soeller W. C., Marians K. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 23, p. 7253–7257.
5. Som T., Tomizawa J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 11, p. 3232–3236.
6. Brosius J. Gene, 1984, v. 27, № 2, p. 151–160.
7. Stueber D., Bujard H. EMBO J., 1982, v. 1, № 11, p. 1399–1404.
8. Tomizawa J., Itoh T., Selzer G., Som T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 3, p. 1421–1425.

9. Boros I., Kiss A., Sain B., Somlyai G., Venetianer P. Gene, 1983, v. 22, № 2/3, p. 191-201.
10. Brosius J., Holly A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 22, p. 6929-6933.
11. Gentz R., Langner A., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Bujard H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 79, № 8, p. 4936-4940.
12. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemiakin M. F. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 247-254.
13. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Paas A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5045-5050.
14. Joyce C. M., Grindley N. D. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 7, p. 1830-1834.
15. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Данилевская О. Н., Ковалев Ю. И. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1196-1204.
16. Грачев С. А., Мамеев С. В., Гуревич А. И., Игошин А. В., Колосов М. П., Слюсаренко А. Г. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 628-630.
17. Shinomiya T., Saito Sh. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 1, p. 43-56.
18. Murray K., Hughes S. G., Brown J. S., Bruce S. A. Biochem. J., 1976, v. 159, № 2, p. 317-322.
19. Bickle T. A., Pirrotta V., Imber P. Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 132-138.
20. Smith L. A., Chirikjian J. G. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 4, p. 1003-1006.
21. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
22. Гуревич А. И., Аваков А. Э. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 301-304.
23. Гуревич А. И., Игошин А. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 487-490.
24. Чупило С. А., Кравченко В. В. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1634-1637.
25. Öjverstedt L.-G., Hammarström K., Balgobin N., Hjerten S., Pettersson U., Chattopadhyaya J. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 782, № 1, p. 120-126.
26. Burns D. M., Beacham I. R. Anal. Biochem., 1983, v. 135, № 1, p. 48-51.
27. Morrison D. A. Meth. Enzymol. 1979, v. 68, p. 904-916.
28. Grunstein M., Wallis J. Meth. Enzymol., 1979, v. 68, p. 379-389.

Поступила в редакцию  
8.VII.1985

## NOVEL PLASMID VEHICLES FOR GENE CLONING AND EXPRESSION

GUREVICH A. I., BABIY N. I., NEKRASOVA O. V., CHERNENKAYA E. A.,

**KOLOSOV M. N.**

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

Multicopy plasmids of pMCR series have been constructed from pRRN2 (a pBR322 derivative) including plasmids carrying transcription terminators downstream the *tet* gene and those with opposite orientation of the *tet* and RNAI genes. The plasmids permit cloning and high expression of genes with strong promoters.