



УДК 577.11 : 547.963.32.04

СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ *lac*-ОПЕРАТОРА *E. COLI*Горобко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В.,
Власов В. П., Колосов М. П.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Недавно нами были синтезированы [1, 2] промоторные линкеры для экспрессии в *E. coli* структурных генов, полученных обратной транскрипцией или химическим синтезом и не имеющих собственных участков инициации трансляции и/или транскрипции. Эти линкеры обладают нуклеотидной последовательностью «идеального» промотора и содержат рестриктный сайт *KpnI* между стартом транскрипции и боксом Прибнау. Чтобы иметь возможность произвольно включать или выключать промотор и таким образом индуцировать или репрессировать ген, мы решили вставить в этот сайт какой-либо оператор, связывание которого с соответствующим белком-репрессором блокировало бы транскрипцию. Наиболее подходящим для этой цели представлялся *lac*-оператор *E. coli*, так как он имеет небольшую длину и хорошо изучен в структурно-функциональном отношении (см. обзоры [3–5]). Биологически активные фрагменты этого оператора уже были ранее синтезированы и клонированы [6–11], но ни один из них не имеет *KpnI*-концов и не пригоден для встраивания в наш искусственный промотор.

Поэтому мы предприняли синтез двухцепочечного полинуклеотида (рис. 1), который, во-первых, снабжен *KpnI*-концами и содержит центральную часть природного *lac*-оператора, необходимую и достаточную для образования прочного комплекса с *lac*-репрессором [3–5,8], и, во-вторых, имеет такую величину и структуру, что при его встраивании в любую ориентации в *KpnI*-сайт промотора должно происходить частичное перекрывание участков связывания РНК-полимеразы и репрессора, а нуклеотидная последовательность и расстояние между боксом Прибнау и стартом транскрипции не изменяется.

Для получения этого полинуклеотида мы химически синтезировали шесть дезоксиолигонуклеотидов (I)–(VI) длиной от 10 до 13 звеньев; синтез проводили фосфотриэфирным методом исходя из динуклеотидных блоков, как при получении гена пептида сна [12]. Затем 3'-концевые и центральные олигонуклеотиды (III)–(V) фосфорилировали Т4-полинуклеотидкиназой и в шестикомпонентном комплексе с нефосфорилированными 5'-концевыми нуклеотидами (I) и (VI) сшивали ДНК-лигазой фага Т4. Образовавшийся 33-членный дуплекс [5'-³²P]-фосфорилировали, выделяли электрофорезом в 15% полиакриламидном геле и анализировали аналогично продуктам лигазных сшивок в работе [12].

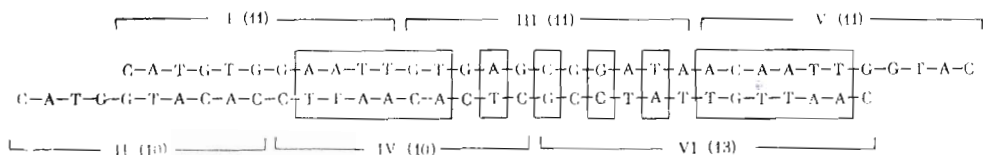


Рис. 1. Синтетический *lac*-оператор. В рамки заключены элементы вращательной симметрии второго порядка, римскими цифрами обозначены химически синтезированные олигонуклеотиды, в скобках указана их величина (число мононуклеотидных звеньев)

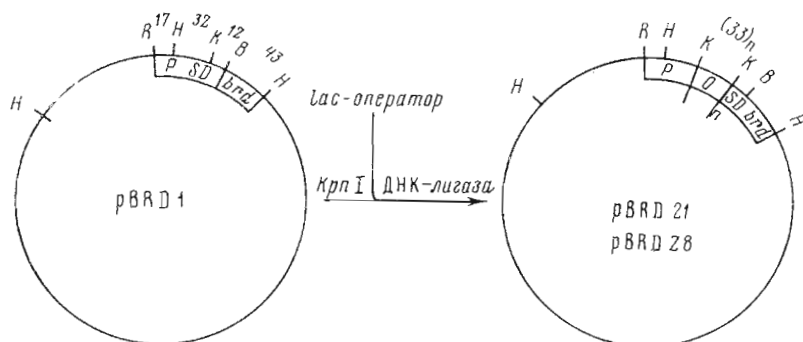


Рис. 2. Схема конструирования рекомбинантных плазмид с синтетическим *lac*-оператором. ДНК pBR322 изображена линией, синтетическая ДНК заключена в рамку. Отмечены места расщепления вставки некоторыми рестриктазами и расстояния между ними в верхней цепи ДНК. *R* — *EcoRI*, *H* — *HindII*, *K* — *KpnI*, *B* — *BamHI*; *P* — промотор, *O* — оператор, *SD* — последовательность Шайна — Дальгарно, *brd* — ген брадикинина

Синтезированный *lac*-оператор клонировали в плазмиде pBRD1 (рис. 2), которая отличается от хорошо известного вектора pBR322 только тем, что в ней сегменты *EcoRI*—*BamHI* и *BamHI*—*SalI* заменены двумя синтетическими ДНК, первая из которых содержит «идеальный» промотор (*P*) и последовательность Шайна — Дальгарно (*SD*), а вторая — искусственный структурный ген брадикинина. Плазмиду pBRD1 гидролизовали рестриктазой *KpnI*, затем лигировали с 5'-фосфорилированным синтетическим *lac*-оператором и полученным веществом трансформировали *E. coli* HB101. Трансформанты выращивали в присутствии ампициллина и среди них отбирали клоны, дающие интенсивно синее окрашивание на индикаторной среде с 40 мкг/мл X-Gal (это окрашивание обусловлено конститутивным синтезом β-галактозидазы и свидетельствует о том, что интегрированный в плазмиде синтетический оператор активно функционирует в живой клетке, связывая *lac*-репрессор и таким образом дерепрессируя *lac*-оперон бактериальной хромосомы). Из *lac*-конститутивных колоний выделяли плазмидные ДНК и рестрикционным анализом определяли число операторных остатков в имеющейся у них синтетической вставке. При расщеплении рестриктазой *HindII* были обнаружены фрагменты ДНК длиной ≈ 120, 150, 185, 220 и 250 пар оснований (п. о.), что соответствует одному, двум, трем, четырем и пяти тандемным операторам (33 *n* + 87 п. о., где *n* 1, 2, 3, 4 и 5).

В связи с тем что лактозный оператор содержит элементы симметрии, но в целом асимметричен, представлялось необходимым установить, как расположены в этих тандамах отдельные операторные участки, т. е. направлены ли они в ту же сторону, что и в природном *lac*-опероне (*O*→), или имеют противоположную ориентацию (←*O*), и соединены ли по типу «голова к хвосту» (прямой повтор) или «голова к голове» и «хвост

ляла собой делеционный мутант плазмиды типа $P(O\rightarrow)(\leftarrow O)SD$, утративший декануклеотидную последовательность ААТТГГТАСС с *Kpn*I-сайтом между операторами.

Интересно, что во всех исследованных нами рекомбинантных плазмидах первый оператор (считая по направлению транскрипции) имел ориентацию, противоположную природной. Единственным исключением являлась плазмида рDSP4 с обращенным повтором $(O\rightarrow)(\leftarrow O)$, но очевидно, что в ней делеция на стыке двух операторов инактивирует один из них, и, возможно, именно первый. В связи с этим следует отметить, что в синтезированном нами *lac*-операторе (рис. 1) расстояние от центра симметрии до разных концов дуплекса не одинаково; разница составляет 6 п. о., т. е. приблизительно $1/2$ витка двойной спирали ДНК, вследствие чего при изменении ориентации оператора участок связывания репрессора перемещается (с инверсией) на противоположную сторону спирали, одновременно удаляясь или приближаясь к участку связывания РНК-полимеразы (о топографии обоих этих участков см. [13]). Как показывает сравнение нуклеотидных последовательностей (рис. 4), комбинация «искусственный промотор+синтетический оператор» имеет большее сходство с регуляторной областью природного *lac*-оперона в том случае, когда оператор ориентирован против направления транскрипции и центр его симметрии смещен в сторону промотора.

Таким образом, нами осуществлен химико-ферментативный синтез функционально активного *lac*-оператора и проведено его клонирование в плазмидных векторах. В результате вставки тандемов этого оператора в рестриктивный сайт между стартовой точкой и Прибноу-боксом искусственного промотора создана возможность регулировать экспрессию на уровне транскрипции и образована матрица для лидерной последовательности перед сайтом связывания рибосомы, присутствие которой в мРНК, по литературным данным [14], необходимо для эффективной инициации трансляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dobrynin V. N., Korobko V. G., Severtsova I. V., Bystrov N. S., Chuvpilo S. A., Kolosov M. N. Synthesis of a model promoter for gene expression in *Escherichia coli*.— Nucl. Acids Res. Sympos. Ser., 1980, № 7, p. 365—376.
2. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Синтез промоторных линкеров для экспрессии генов в *E. coli*.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1740—1742.
3. Barkley M. D., Bourgeois S. Repressor recognition of operator and effectors.— In: The operon / Eds Miller J. H., Reznikoff W. S. Cold Spring Harbor Labor., 1978, p. 177—220.
4. Goeddel D. V., Yansura D. G., Caruthers M. H. How *lac* repressor recognizes *lac* operator.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 8, p. 3578—3582.
5. Caruthers M. H. Deciphering the protein—DNA recognition code.— Account. Chem. Res., 1980, v. 13, p. 155—160.
6. Bahl C. P., Mariani K. J., Wu R., Stawinsky J., Narang S. A. A general method for inserting specific DNA sequences into cloning vehicles.— Gene, 1976, v. 1, p. 81—92.
7. Heyneker H. L., Shine J., Goodman H. M., Boyer H. W., Rosenberg J., Dickerson R. E., Narang S. A., Itakura K., Lin S.-Y., Riggs A. D. Synthetic *lac* operator DNA is functional in vivo.— Nature, 1976, v. 263, p. 748—752.
8. Bahl C. P., Wu R., Stawinsky J., Narang S. A. Minimal length of the lactose operator sequence for the specific recognition by the lactose repressor.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 966—970.
9. Mariani K. J., Wu R., Stawinsky J., Hozumi T., Narang S. A. Cloned synthetic *lac* operator DNA is biologically active.— Nature, 1976, v. 263, p. 744—748.
10. Sadler J. R., Betz J. L., Tecklenburg M., Goeddel D. V., Yansura D. G., Caruthers M. H. Cloning of chemically synthesized lactose operators. II. *Eco*RI-linked operators.— Gene, 1978, v. 3, p. 211—232.
11. Sadler J. R., Tecklenburg M., Betz J. L. Plasmids containing many tandem copies of a synthetic lactose operator.— Gene, 1980, v. 8, p. 279—300.
12. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Власов В. П., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Синтез и клонирование искусственного структурного гена пептида спа.— Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1745—1749.
13. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. *E. coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters.— Cell, 1980, v. 20, p. 269—281.

14. Steitz J. A. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA.— In: Biological regulation and development, v. 1, Gene Expression. / Ed. Goldberg K. E. Plenum Press, 1979, p. 349—399.

Поступило в редакцию
25.VI.1981

SYNTHESIS AND CLONING OF *lac* OPERATOR OF *E. coli*

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., SEVERTSOVA I. V.,
VLASOV V. P., KOLOSOV M. N.

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

A double-stranded short DNA containing an essential 26 b.p. sequence of *E. coli* lactose operator and terminating in the *Kpn*I protruding ends (Fig.1) was assembled of six deoxyoligonucleotides chemically prepared by the phosphotriester method. The synthetic *lac* operator was inserted into the unique *Kpn*I site of a vector (pBRD1) derived from pBR322 by substituting an *Eco*RI/*Bam*HI and a *Bam*HI/*Sal*I terminated synthetic duplexes for the respective restriction fragments of the parent plasmid. On cloning into *E. coli* HB101, a series of recombinants (pBRD21—pBRD28, Fig.2) were isolated which contained up to five tandem copies of the synthetic operator. The substitution, in the five-operator plasmid pBRD22, of a minor *Bam*HI/*Sal*I fragment by a synthetic gene for delta sleep inducing peptide followed by digestion with restriction nuclease *Kpn*I, religation, and recloning resulted in another recombinant series designated pDSP. The nucleotide sequence determination of the plasmids of the two series revealed the presence of both direct and inverted repeats of the synthetic insert. In most recombinants, the first operator (i. e. the one located next to the promoter) was found to be reversed as compared with its direction in the natural *lac* operon. The possible significance of this reversal is discussed in terms of steric relations between binding sites for *lac* repressor protein and RNA polymerase.
