



УДК 547.963.32.04

## ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ПРОМОТОРОВ

Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Чувпило С. А.,  
Северцова П. В., Шингарова Л. Н., Колосов М. Н.

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

На основе плазмиды рВR322 [1] нами сконструирован новый вектор для клонирования промоторов, узнаваемых РНК-полимеразой *E. coli*. Этот вектор, рВR322mpt5, отличается от плазмиды рВR322 дикого типа тем, что у него ген *tet*, кодирующий устойчивость к тетрациклину ( $Tc^r$ ), дезактивирован в результате делеции существенной части промотора ( $P_{tet}$ ), а рядом с сайтом *EcoRI* имеется сайт *KpnI* (рис. 1). При вставке в любой из этих сайтов промоторсодержащего фрагмента ДНК, ориентированного от *EcoRI* к *KpnI* (считая по направлению транскрипции), происходит реактивация гена *tet*, что позволяет легко селекционировать рекомбинанты по фенотипическому изменению  $Tc^s \rightarrow Tc^r$ .

Для получения этого вектора нами была использована описанная ранее мутантная плазида рВR322mpt2 [3]. Ее гидролизовали эндонуклеазой *EcoRI* и *KpnI*, затем дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой (30 мин при 60°С) и хроматографировали на биогеле А15m. Выделенную ДНК лигировали ДНК-лигазой Т4 с декадезоксинуклеотидом рААТТСGGTAC, который был для этой цели синтезирован фосфоритриэфирным способом и 5'-фосфорилирован Т4-полинуклеотидкиназой. После трансформации *E. coli* НВ101 по методу [5] были отобраны клоны, чувствительные к тетрациклину (при 25 мкг/мл); оказалось, что во всех них плазмидная ДНК содержит два сайта *HindIII* и по одному сайту *EcoRI* и *KpnI*. ДНК из двух клонов была проанализирована, как описано в работе [6]. С этой целью она была разрезана эндонуклеазой *EcoRI*, затем 3'-концы достроены с помощью [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]dАТР и ТТР в присутствии ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова), ДНК гидролизована эндонуклеазой *MspI* и радиоактивные фрагменты длиной 149 и 463 пары оснований (п.о) выделены электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле (ПАГ). Определение нуклеотидной последовательности меньшего фрагмента по методу Максама — Гилберта [7] показало, что ДНК из обоих анализируемых клонов имеет структуру 111 (рис. 1).

Полученная нами плазида рВR322mpt5 сохраняет все уникальные рестриктные сайты, имевшиеся в рВR322 дикого типа, за исключением сайта *HindIII*, который из нее удален вместе с предшествующей частью промотора  $P_{tet}$  и заменен новым уникальным сайтом, *KpnI*. Применение этой плазмиды в качестве вектора для промоторов было продемонстрировано на следующих двух примерах клонирования фрагментов ДНК *E. coli* и бактериофага Т7 (рис. 2).

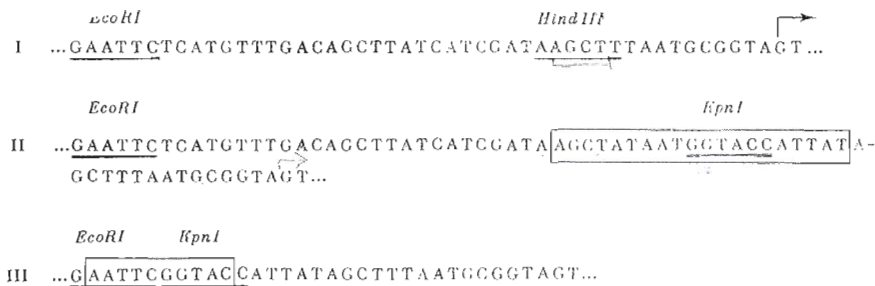


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность верхней цепи промотора  $P_{tel}$  в плазмиде  $pBR322$  дикого типа (I) [2] и ее мутантах  $mpt2$  (II) [3] и  $mpt5$  (III). Подчеркнутые рестриктные сайты, в рамки заключены вставки снятых олигонуклеотидов, стрелкой обозначен старт транскрипции гена  $tel$  [4]

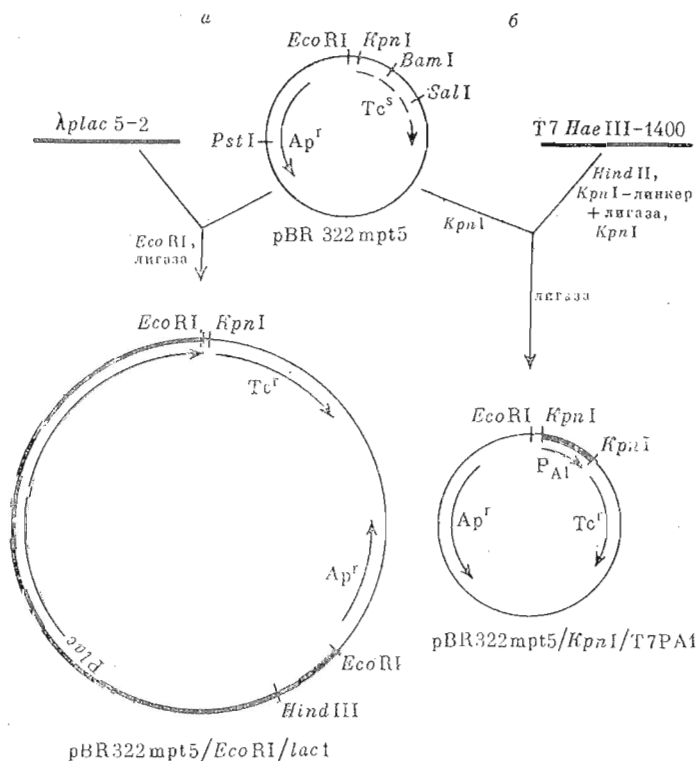


Рис. 2. Схема клонирования промоторов (P) в плазмидном векторе  $pBR322mpt5$ . а — клонирование  $EcoRI$ -фрагмента  $lac$ -оперона  $E. coli$  в  $EcoRI$ -сайте вектора, б — клонирование  $HindIII$ -фрагментов промоторной области А ранних генов бактериофага T7 в  $KpnI$ -сайте вектора

Плазмиду  $pBR322mpt5$  вместе с ДНК трансдуцирующего фага  $\lambda lac5-2$  [8], которая содержит промоторно-операторную область и структурный ген  $Z$  (а также часть генов  $I$  и  $Y$ )  $lac$ -оперона  $E. coli$ , гидролизировали эндонуклеазой  $EcoRI$ , затем лигировали ДНК-лигазой T4 и использовали для трансформации  $E. coli$  HB101, выращивая трансформанты в присутствии 25 мкг/мл тетрациклина. Все  $Tc^r$ -колонии давали синее окрашивание на индикаторной среде с X-gal и содержали рекомбинантную плазмиду  $pBR322mpt5/EcoRI/lac1$  (рис. 2а), структура которой была доказана рестриктным анализом, по образованию двух фрагментов (4,4 и 2,8 мегадальтона) при гидролизе эндонуклеазой  $EcoRI$  и двух фрагментов (3,8

и 3,4 мегадальтона) при совместном гидролизе рестриктазами *Hind*III и *Kpn*I.

Клонирование в *Kpn*I-сайте вектора проводили с помощью линкера — самокомплементарного 16-членного олигонуклеотида АТААТGGTACCАТ-ТАТ, полученного лигазным сшиванием декануклеотида АТААТGGTАС с гексануклеотидом рСАТТАТ, которые были синтезированы фосфоритриэфирным методом в процессе конструирования искусственных промоторов [9]. Левый кощевой *Hae*III-фрагмент (около 1400 п.о.) ДНК бактериофага Т7, содержащий промоторную область  $\Lambda$  ранних генов фага, был выделен описанным способом [10]. Его гидролизовали эндонуклеазой *Hind*II, образовавшиеся субфрагменты сшивали ДНК-лигазой Т4 с 5'-фосфорилированным синтетическим линкером, затем гидролизовали эндонуклеазой *Kpn*I и лигировали с вектором, который предварительно расщепили той же нуклеазой (рис. 2б). Полученной ДНК трансформировали *E. coli* НВ101, трансформанты клошировали в присутствии ампициллина и тетрациклина (по 25 мкг/мл каждого) и плазмидную ДНК из  $Ap^rTc^r$ -колоний анализировали, расщепляя эндонуклеазой *Kpn*I и определяя величину рестриктот электрофорезом в 5% ПАГ с *Bsp*I-гидролизатом рВR322mpt5 в качестве свидетеля. В одной из рекомбинантных плазмид была обнаружена *Kpn*I-вставка, величина которой (около 300 п.о.) соответствовала ожидаемой для *Hind*II-фрагмента ДНК Т7 (275 п.о.), содержащего промотор А1 и удлиненного с двух сторон линкером (2×10 п.о.). Нуклеотидная последовательность этой плазмиды, обозначенной рВR322mpt5/*Kpn*I/Т7РА1, была определена так же, как описано выше для векторной плазмиды рВR322mpt5, и идентифицирована с опубликованной последовательностью промоторной области бактериофага Т7 [11, 12].

Таким образом, полученный нами плазмидный вектор рВR322mpt5 позволяет легко выделять и идентифицировать (секвенировать) промоторсодержащие фрагменты ДНК. По сравнению с описанными ранее плазмидами рВRН1—рВRН4 [4, 13], он имеет то очевидное преимущество, что пригоден для клонирования фрагментов не только с *Eco*RI-, но и с *Kpn*I-концами. Очевидно также, что метод его получения — лигазное сшивание двухцепочечной плазмидной ДНК с одноцепочечным синтетическим олигонуклеотидом и затем заполнение оставшегося гэпа *in vivo* — является общим и может быть использован для конструирования других промоторных векторов с различными дополнительными сайтами эндонуклеаз рестрикции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heynecker H. L., Boyer H. W., Cross J. H., Falkow S. (1977) *Gene*, **2**, 95—113.
2. Sutcliffe J. G. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 77—90.
3. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Чувило С. А., Пштарова Л. Н., Колосов М. П. (1980) *Биоорган. химия*, **6**, 1743—1745.
4. Rodriguez R. L., West R. W., Heynecker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **6**, 3267—3287.
5. Hersfield V., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinski D. R. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3455—3459.
6. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. П., Городелский С. И., Слюсаренко С. А., Капельнская Т. В., Лисенков А. Ф., Дубилин Н. П. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 1802—1815.
7. Maxam A. M., Gilbert W. (1980) in: *Methods in Enzymology*, vol. 65 (Crossman L., Moldave K., eds), pp. 499—560, Academic Press, New York.
8. Pourcel C., Marchal C., Louise A., Fritsch A., Tiollais P. (1979) *Mol. Gen. Genet.*, **170**, 161—169.
9. Dobrynin V. N., Korobko V. G., Severtsova I. V., Bystrov N. S., Chuvpilo S. A., Kolosov M. N. (1980) *Nucl. Acids Symp. Ser. No 7*, 365—376.
10. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. (1978) *Докл. АН СССР*, **239**, 475—478.
11. Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1980) *Биоорган. химия*, **6**, 1268—1270.

12. Коробко В. Г., Чувпило С. А., Грачев С. А., Колосов М. Н., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 1692-1694.  
13. West R. W., Neve R. L., Rodriguez R. L. (1979) *Gene*, 7, 271-288.

Поступила в редакцию  
13.X.1980

## A PLASMID VECTOR FOR CLONING OF PROMOTERS

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., CHUVPILLO S. A., SEVERTSOVA I. V.,  
SHINGAROVA L. N., KOLOSOV M. N.

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

A specialized vector for cloning of bacterial promoters has been constructed of plasmid pBR322 with the use of chemically synthesized oligodeoxynucleotides. In the vector, designated as pBR322mpt5, the *EcoRI* restriction site is followed by the *KpnI* recognition sequence while an essential portion of the promoter for gene *tet* (including its *HindIII* site) is deleted, which renders the gene silent and results in tetracycline sensitivity for the host strain. Cloning of *EcoRI* or *KpnI* cleaved DNA fragments into the respective site of this vector allows for the easy isolation of promoter-containing recombinants due to the  $Tc^r$  phenotype acquired on the insertional activation of gene *tet*. The utility of the new vector was demonstrated by cloning of a *lac* promoter-containing *EcoRI* fragment of DNA  $\lambda plac5$  and of an A1 promoter-containing *HindII* fragment of DNA T7 into the *EcoRI* and *KpnI* site of the vector, respectively, a synthetic deoxynucleotide ATAATGGTACCATTAT being used as a *KpnI* adaptor for the *HindII* fragment.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

---

Сдано в набор 20.11.80      Подписано к печати 13.01.81      Т-03209      Формат бумаги 70×108<sup>1/16</sup>  
Высокая печать      Усл. печ. л. 14,0      Уч.-изд. л. 13,9      Бум. л. 5,0      Тираж 886 экз. Зак. 3673

---

Издательство «Наука». 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10