



УДК 547.963.32.04 p/c +

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРЕХ ГЛАВНЫХ ПРОМОТОРОВ БАКТЕРИОФАГА ϕ X174 ПРИ ЭКСПРЕССИИ *tet*- И *gal*-ОПЕРОНОВ *E. COLI* IN VIVOФедченко В. И., Долганов Г. М., Акопьянц Н. С.,
Честухин А. В., Шемякин М. Ф.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Для определения сравнительной активности трех главных промоторов фага ϕ X174 (A, B и D) *in vivo* на основе плазмид pBRN4 и pHD 68-17 были сконструированы рекомбинантные молекулы, содержащие промоторы фага ϕ X174, а также промоторы G2 фага fd и *lacUV5*. Все эти промоторы вставлены вместо природных перед *tet*-опероном в pBRN4 и перед *gal*-опероном в pHD68-17. Эффективность промоторов сравнивали по устойчивости трансформированных исследуемыми плазмидами клеток *E. coli* к тетрациклину (pBRN4) или по экспрессии *gal*-оперона (pHD68-17). Показано, что все три главных промотора фага ϕ X174 активно участвуют в экспрессии как *tet*-, так и *gal*-оперона *in vivo*. Самым активным из всех исследованных промоторов является промотор D фага ϕ X174.

Несмотря на малые размеры генома бактериофага ϕ X174 при его внутриклеточном развитии обнаруживается более 20 видов вирус-специфических РНК [1], что вдвое превышает число известных генов фага. Многие из этих РНК являются полицистронными [2]. Вместе с тем синтез РНК очищенной РНК-полимеразой на изолированной репликативной форме (RF1) ДНК фага иницируется на трех промоторах: A, B и D, расположенных перед началом соответствующих генов, и останавливается на одном р-независимом терминаторе [3]. В определенных условиях в бесклеточной системе инициацию и терминацию синтеза РНК можно обнаружить еще в нескольких точках фаговой хромосомы [4].

Практически все сведения о регуляции транскрипции ϕ X174 были получены *in vitro*, так как исследование ее *in vivo* традиционными методами затруднено у этого фага по ряду причин [5]. В данной работе мы попытались оценить *in vivo* относительную активность трех главных промоторов фага ϕ X174 (A, B и D) по экспрессии *tet*- и *gal*-оперонов в клетках *E. coli*, несущих соответствующим образом сконструированные плазмиды.

1. Конструирование и клонирование плазмид, содержащих главные промоторы фага ϕ X174

Сравнительную оценку эффективности («силы») промоторов можно осуществить, определяя экспрессию природных оперонов, у которых исходный промотор заменен на исследуемые. В качестве таких тест-оперонов были выбраны *tet*-оперон в составе плазмиды pBRN4 и *gal*-оперон в составе плазмиды pHD68-17. В обеих плазмидах промоторы указанных оперонов элиминированы и перед началом структурных генов расположены участки узнавания рестриктазой *EcoRI* и последовательности Шайн-Дальгарно [6]. Эти свойства данных плазмид и позволяют использовать их для сравнительной оценки «силы» разнообразных промоторов.

Плазмида pBRN4, сконструированная Родригесом с соавт. [7] на основе плазмиды pBR322 специально для определения эффективности вставляемых в нее промоторов, обладает рядом недостатков, которые затруд-

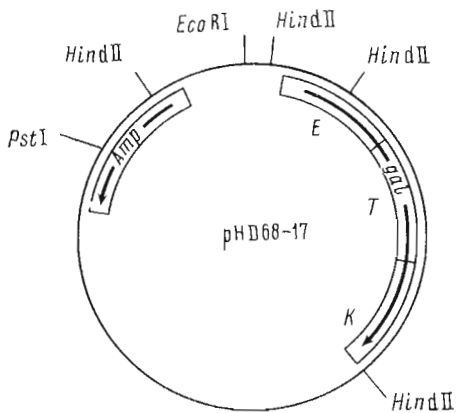


Рис. 1. Карта плазмиды pHDB68-17

ленной промоторно-операторной областью. Полученная таким образом плазмида обладает фенотипом Ap^r , Tc^s , и единственный на плазмиде сайт *EcoRI* расположен перед последовательностью Шайп-Дальгарно *gal*-оперона. Плазмида pHDB68-17 содержит также одиночные участки узнавания других рестриктаз, которые позволяют легко анализировать рекомбинантные молекулы (рис. 1).

Таким образом, обе плазмиды содержат по единственному сайту *EcoRI*. По данным сайтам можно клонировать в составе плазмид анализируемые промоторы. Об активности клонируемых промоторов можно судить в случае pBRN4 по появлению Tc^r -колоний, а при использовании pHDB68-17 — по появлению пурпурноокрашенных *gal*⁺-колоний на среде ЭМС Леви-на [9].

RFI ДНК фага ϕ X174 содержит довольно много мест узнавания для целого ряда широко используемых рестриктаз [10]. Поэтому промоторсодержащие фрагменты подходящей длины (~200 пар оснований) оказалось возможным получить, используя RFI и рестриктазы *AluI* (A-фрагменты) и *HindII* (R-фрагменты). Были выделены следующие фрагменты: A7b, содержащий промотор A; A6, содержащий промотор D, и R8, предположительно содержащий промотор(ы) B. Фрагменты A6 и R8 выделяли непосредственно из гидролизатов RFI ДНК, полученных в результате действия соответствующих рестриктаз, тогда как фрагмент A7b — из *AluI*-гидролизата изолированного фрагмента R4.

К полученным фрагментам по обоим «тупым» концам ферментативно присоединяли октануклеотидные линкеры, содержащие участки узнавания рестриктазой *EcoRI*, затем такие фрагменты, как и исходные плазмидные ДНК, обрабатывали эндонуклеазой *EcoRI* и использовали для получения рекомбинантных молекул с помощью T4-ДНК-лигазы. Общая схема встраивания промоторов фага ϕ X174 показана на рис. 2.

Аналогичным образом были получены клоны, несущие плазмиды со встроенным промотором *lacUV5*, вырезанным из плазмиды pSK-203 [11], и со встроенным, исходно синтетическим промотором G2 фага fd, вырезанным из плазмиды pR9E [12]. Эти плазмиды были получены для того, чтобы сравнить по активности в одних и тех же условиях промоторы ϕ X174 с другими, хорошо охарактеризованными промоторами.

Рекомбинантными молекулами, полученными на основе pBRN4, трансформировали клетки *E. coli* K12 HB101, после чего отбирали колонии, способные расти в присутствии тетрациклина. Эффективность трансформации колебалась в пределах 10^5 – 10^3 колоний/мкг ДНК для плазмид с разными вставленными промоторами. Производными плазмиды pHDB68-17 трансформировали клетки *E. coli* K12 KS1366. Штамм был сконструирован нами специально для этой цели (см. «Экспериментальную часть»). Отбирали колонии, способные сбраживать галактозу. Эффективность трансформации лежала в пределах 10^5 – 10^3 колоний/мкг ДНК.

няют количественную оценку активности промоторов. К числу этих недостатков относятся инициация транскрипции *tet*-локуса на нескольких разнонаправленных промоторах и разнообразие путей возникновения тетрациклин-устойчивых штаммов [8].

Более удобна для изучения сравнительной активности промоторов плазмиды pHDB68-17, сконструированная Г. Фрицем (ФР1) и любезно предоставленная им в наше распоряжение. Эта плазмиды создана на основе вектора pBR322 в результате замещения *EcoRI*–*SalI*-фрагмента на фрагмент *gal*-оперона *E. coli* с уда-

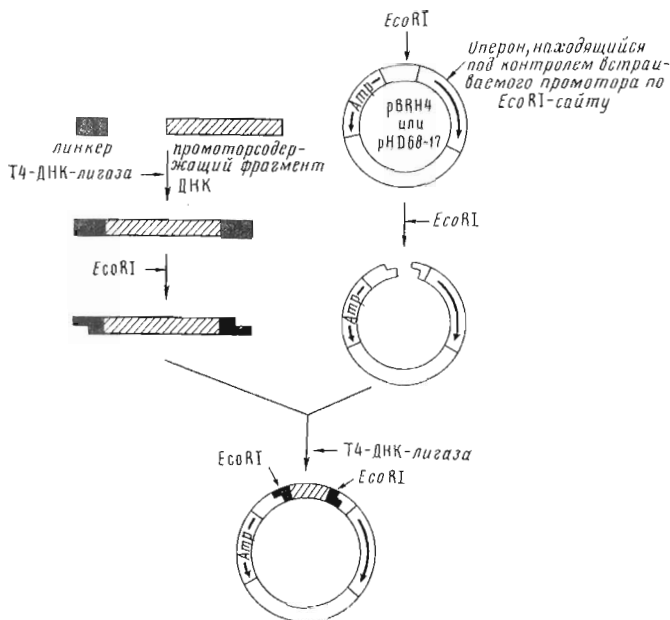


Рис. 2. Схема конструирования гибридных плазмид

2. Анализ полученных клонов

Использованный путь встраивания фрагментов ДНК в плазмиды может привести как к правильной, так и к неправильной ориентации промотора относительно *gal*- или *tet*-оперона. Кроме того, возможно встраивание нескольких фрагментов в одну плазмиду. Условия селекции обеспечивали избавление от клонов, несущих плазмиды с неправильно ориентированными одиночными промоторами. Однако среди отобранных клонов могли встречаться мультипромоторные плазмиды, если хотя бы один из встроенных промоторов имеет правильную ориентацию. Поэтому из полученных клонов нужно было отобрать такие, плазмиды которых содержали бы только один промоторный фрагмент.

Чтобы найти такие клоны, был проведен рестриктивный анализ плазмидной ДНК, которая была выделена из нескольких клонов каждого варианта сшивки и подвергнута обработке рестриктазой *EcoRI*, взятой в лимитирующей и насыщающей концентрациях. Следовало ожидать, что монопромоторные плазмиды должны давать при обоих режимах переваривания *EcoRI* один низкомолекулярный фрагмент, близкий по размерам исходному фрагменту ДНК \varnothing X174, взятому для встраивания. В то же время мультипромоторные плазмиды должны давать при лимитирующей концентрации рестриктазы более чем один низкомолекулярный фрагмент или, если он один, то его размеры должны почти превышать размеры исходно встраиваемого фрагмента. Последний вариант рекомбинантных плазмид может возникнуть в результате лигазной сшивки двух фрагментов без промежуточного *EcoRI*-линкера. Кроме того, если фрагмент встроился в плазмиду хотя бы без одного линкера, то такая плаزمид не расщепится на фрагменты при любой концентрации рестриктазы. Подобный анализ двух моноклональных плазмид, производных рHD68-17, первая из которых содержит одну копию встроенного фрагмента, а другая — две, показан на рис. 3. Таким путем было отобрано по несколько клонов монопромоторных плазмид — производных рHD68-17, получивших следующие обозначения. Плазмиды со встроенным фрагментом A7b, содержащим промотор A, мы обозначили рHD- \varnothing X174- P_A с добавлением порядкового номера клона. По такому же принципу были обозначены и другие полученные рекомбинантные плазмиды: рHD- \varnothing X174- P_B , рHD- \varnothing X174- P_D , рHD-fd- P_{G2} и рHD- P_{lacUV5} .

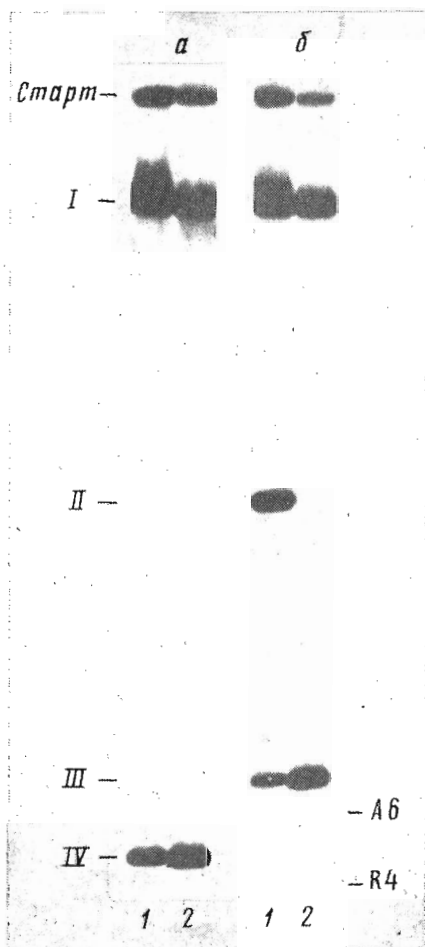


Рис. 3. Анализ рекомбинантных форм рHD68-17-плазмид в условиях лимитирующей (1) и насыщающей (2) концентраций рестриктазы *EcoRI*: а — гибридная плаزمида рHD68-17, содержащая одну копию встроенного фрагмента ДНК R4 по *EcoRI*-сайту (полоса IV); б — гибридная плазмида рHD68-17, содержащая две копии фрагмента ДНК А6, встроенного по *EcoRI*-сайту (полосы II и III). Полоса I — линейная форма плазмиды рHD68-17

Рекомбинанты, полученные на основе плазмиды рРНН4, были обозначены по вышеуказанному принципу: рРНН4-ØX174-Р_А и т. д.

Идентичность вставленных фрагментов исходным была подтверждена в результате определения первичной структуры *EcoRI*-фрагментов соответствующих рекомбинантных плазмид по методу Максама — Гилберта [13].

3. Определение активности встроенных промоторов

Каждый из трех главных промоторов фага ØX174, будучи встроенным в плазмиду рРНН4, приводил к восстановлению экспрессии *tet*-оперона. Это сопровождалось появлением клонов клеток *E. coli*, устойчивых к тетрациклину. Как видно из табл. 1, наиболее высокую экспрессию *tet*-оперона вызывал промотор D: клетки, несущие плазмиду с этим промотором, выживали даже при более высоких концентрациях тетрациклина, чем клетки, несущие плазмиду рBR322 с природным *tet*-промотором.

Активность двух других промоторов фага ØX174 (А и В) в экспрессии *tet*-оперона оказалась намного ниже и приближалась к активности промотора G2 фага fd. Из всех исследованных промоторов самой низкой активностью обладал *lac UV5*.

Как и следовало ожидать, количественно более четкая картина была получена при исследовании относительной эффективности промоторов по экспрессии *gal*-оперона в составе плазмид, сконструированных на основе плазмиды рHD68-17. Об эффективности экспрессии мы судили по появлению в клетках галактокиназной и уридилтрансферазной активностей, катализируемых ферментами — продуктами структурных генов *gal*-оперона. Встраивание каждого из трех главных промоторов фага ØX174 черед структурными генами *gal*-оперона в плазмиду рHD68-17 привело к

Сравнение функциональной активности промоторов в составе рекомбинантных плазмид pBRH4 по выживаемости клеток *E. coli* на среде с тетрациклином

Рекомбинантная плаزمида	Промотор	Концентрация тетрациклина, мкг/мл
pBR322	<i>tet</i>	75
pBRH4- \emptyset X174- P_D	P_D фага \emptyset X174	90
pBRH4- \emptyset X174- P_A	P_A фага \emptyset X174	15
pBRH4- \emptyset X174- P_B	P_B фага \emptyset X174	15
pBRH4-fd- P_{G2}	P_{G2} фага fd	15
pBRH4- P_{lacUV5}	P_{lacUV5}	10

Таблица 2

Сравнение функциональной активности промоторов в составе рекомбинантных плазмид pHD68-17 по активности ферментов *gal*-оперона в клеточных экстрактах

Рекомбинантная плазмида	Промотор	Номера клонов	Активность уридилтрансферазы, %	Активность галактокиназы, %
pKS-100	<i>gal</i> -оперона	—	100	100
pHD- \emptyset X174- P_D	P_D фага \emptyset X174	1 2 3	166 178 158	155 181 182
			167±7	173±12
pHD- \emptyset X174- P_A	P_A фага \emptyset X174	1 2 3	74 91 75	91 92 79
			80±7	87±6
pHD- \emptyset X174- P_B	P_B фага \emptyset X174	1 2 3	78 65 59	85 69 76
			67±7	77±6
pHD-fd- P_{G2}	G2 фага fd	1 2 3	137 103 129	130 136 144
			123±13	137±5
pHD- P_{lacUV5}	<i>lacUV5</i>	1 2 3	49 28 31	67 41 47
			36±9	52±10

появлению в клетках *E. coli gal*⁻, несущих такие плазмиды, значительной активности галактокиназы и уридилтрансферазы, определяемой в клеточных экстрактах (табл. 2). Активность уридилтрансферазы были наивысшей в экстрактах клеток, содержащих плазмиду со встроенным D-промотором; при этом активность D-промотора оказалась в 1,6 раз выше активности природного *gal*-промотора в составе плазмиды pKS-100. На втором месте по эффективности экспрессии гена уридилтрансферазы находится промотор G2 фага fd. Активность промоторов A и B фага \emptyset X174 ниже активности природного *gal*-промотора, но превышает примерно в 2 раза активность промотора *lacUV5*.

Относительная активность исследуемых промоторов в индукции галактокиназы была примерно такой же, как и в случае уридилтрансферазы. Следует лишь отметить, что все промоторы в отношении индукции этого фермента проявляли несколько более высокую активность по сравнению с индукцией ими уридилтрансферазы.

Поскольку все исследованные нами промоторы находились в составе соответствующих фрагментов ДНК в окружении различных и по длине, и по нуклеотидным последовательностям участкам, возникает вопрос: можем ли мы на основании полученных данных сравнивать «силу» этих промоторов? Скорее всего на этот вопрос можно ответить положительно, так как во всех случаях транскрибируемые участки вставленных фрагментов не содержат палиндромных структур, а точка инициации трансляции

Определение числа копий рекомбинантных плазмид в клетке

Плазмидная ДНК	Молекулярная масса · 10 ⁻⁶	Плазмидная ДНК, имп/мин	Хромосомная ДНК *, имп/мин	Отношение	Число копий **
pHD68-17	4,20	623	18 536	0,034	18
pKS-100	4,51	988	21 440	0,046	23
P _A	4,32	716	16 974	0,042	22
P _B	4,32	1174	23 519	0,050	26
P _D	4,32	656	17 082	0,038	20

* Молекулярная масса хромосомной ДНК *E. coli* 2,25·10⁹ [14].

** Если плазида составляет 3,4% от хромосомной ДНК, т. е. имеет M 77·10⁶, то для плазмиды с молекулярной массой 4,2·10⁶ число копий равно 18.

первого определяемого фермента, уридилтрансферазы, удалена от этих участков на большое, одинаковое во всех случаях расстояние — длину первого гена оперона, кодирующего эпимеразу. Следовательно, условия инициации трансляции изученных ферментов должны быть по существу одинаковыми при экспрессии всех сконструированных плазмид, и поэтому различная активность этих ферментов скорее всего связана с различной эффективностью встроенных перед *gal*-опероном промоторов.

Чтобы выяснить, являются ли полученные нами различия в активности промоторов истинным отражением их разной эффективности или же объясняются неодинаковым количеством плазмид, в ряде исследуемых штаммов с рекомбинантными плазмидами было определено число копий плазмид на клетку. Как видно из табл. 3, различия в числе копий плазмид, содержащих промоторы фага ϕ X174, не могут служить объяснением различий в экспрессии этих промоторов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все три главных промотора фага ϕ X174 могут активно участвовать в экспрессии как *tet*-, так и *gal*-оперона *in vivo*. Из них наибольшей активностью обладал промотор D, эффективность которого была максимальной в обеих тест-системах. Активность этого промотора значительно превышала активность природных промоторов интактных *tet*- и *gal*-оперонов или часто используемого в практике генной инженерии промотора *lacUV5*. Она заметно превышала активность сильного G2-промотора фага fd в *gal*-опероне и многократно — в *tet*-опероне. Поэтому можно думать, что D-промотор фага ϕ X174 найдет широкое применение в генной инженерии, особенно для экспрессии искусственных генов при микробиологическом производстве веществ пептидно-белковой природы.

Экспериментальная часть

В работе использовали дрожжевой экстракт, триптон, агар эозин, метиленовый синий (Difco, США); D-галактозу, глицерин, додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ); акриламид, трис, формамид, ортофосфорную кислоту (Merck, ФРГ), бромистый этидий, дитиотреит, АТФ, бычий сывороточный альбумин (Calbiochem, Швейцария); сефадекс G-75 (Pharmacia, Fine Chemicals, Швейцария), 2-меркаптоэтанол, N,N'-метиленисакриламид, гидроксипатит, биогель А-15m, дауэкс-50, агарозу, кумасси G-250 (Bio-Rad, США), лизоцим (Worthington, Англия); EDTA (Sigma, США); D-[¹⁴C] галактозу, [¹⁴C] галактозо-1-фосфат, [γ -³²P] АТФ, [α -³²P] АТФ, [α -³²P] ТТР (Amersham, Англия), антибиотики ампициллин и тетрациклин отечественного производства. Все соли и мочевины — квалификации ос.ч. В работе использовали штаммы бактерий и бактериофагов, приведенные в табл. 4.

T4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.4) и T4-полипуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) выделяли по методу [16], ДНК-полимеразу I *Bacillus subtilis* — по методу [17], эндонуклеазы *HindII* и *HindIII* — по методу [18], *AluI* и *EcoRI* — по методу [19], щелочную фосфатазу — по методу [20], RFI ДНК бакте-

Использованные штаммы бактерий и бактериофагов

Штамм	Генотип	Источник
KS5	F ⁻ , Δ <i>gal</i> , Δ(<i>bio-nad</i>)	Т. С. Ильина (Москва)
KS1366	F ⁻ , Δ <i>gal</i> , <i>recA</i> , <i>Tc</i> ^R	Коллекция лаборатории
NK6659	<i>recA</i> , <i>Tc</i> ^R	Г. Б. Смирнов (Москва)
HB101	F ⁻ , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>gal</i> , <i>lacY</i> , <i>sh</i> ⁺ , <i>r</i> , <i>m</i> , <i>Endo</i> , I, <i>recA</i>	[15]
ØX174	ØX174	Коллекция лаборатории
P1 _{vir}	P1 _{vir}	То же

риофага ØX174 — по методу [21]. Фрагменты рестрикции *Hind*II, R4 и R8 в препаративных количествах получали разделением продуктов гидролиза RFI ДНК фага ØX174 эндонуклеазой *Hind*II. Реакционную смесь (5 мл), содержащую 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 6 мМ дитиотреит (буфер А), 3 мг ДНК и 5000 ед. акт. эндонуклеазы *Hind*II, инкубировали 1 ч при 37° С. Полноту рестрикции контролировали разделением гидролизата электрофоретически в 1% агарозе по методу [22].

Для выделения фрагментов R4 и R8 гидролизат разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле по методу [22]. Для этого реакционную смесь обрабатывали дважды нейтральным фенолом, ДНК осаждали этанолом, растворяли в 3 мл электродного буфера, содержащего 30% глицерина и 50 мкг/мл бромистого этидия, и наносили на градиентный гель (4–18%) размером 400×200×4 мм. Электрофорез вели при токе 50 мА в течение 20 ч. Разделение фрагментов ДНК контролировали визуально в УФ-свете и выделяли ДНК из геля методом электроэлюции (см. ниже).

Фрагмент рестрикции *Alu*I-А6 в препаративных количествах получали разделением продуктов гидролиза RFI-формы ДНК ØX174 эндонуклеазой *Alu*I. Реакционную смесь (5 мл), содержащую 6 мМ трис-НСl (рН 7,6), 6 мМ MgCl₂, 6 мМ 2-меркаптоэтанол (буфер В), 3 мг ДНК и 3000 ед. акт. эндонуклеазы *Alu*I, инкубировали 1 ч при 37° С, охлаждали, обрабатывали дважды фенолом. ДНК осаждали этанолом, растворяли в 3 мл электродного буфера и наносили на градиентный (4–20%) полиакриламидный гель. Электрофорез, идентификацию фрагментов и элюцию их из геля проводили так же, как и для фрагментов R4 и R8.

Фрагмент рестрикции *Alu*I (A7b) получали из фрагмента R4 обработкой эндонуклеазой *Alu*I. Реакционную смесь (1 мл), содержащую буфер В, 100 мкг ДНК фрагмента R8 и 200 ед. акт. эндонуклеазы *Alu*I, инкубировали 1 ч при 37° С. Фрагменты разделяли в 10% полиакриламидном геле (200×150×1,5 мм). Далее все операции проводили так же, как и при выделении фрагментов R4, R8 и А6.

Электроэлюцию фрагментов ДНК из полиакриламидного геля проводили в аппарате, состоящем из двух сообщающихся камер, которые отделены от электродного буфера полупроницаемыми мембранами. В одну из камер помещали полоску геля с фрагментом ДНК. В другую камеру пассивировали 0,3 мл гидроксиапатита. После этого камеры заполняли электродным буфером и вели электроэлюцию 5 ч при 30 мА. При этом фрагменты ДНК выходили из геля и прочно связывались с гидроксиапатитом [24]. Последний осторожно собирали с пленки и наносили на комбинированную колонку с дауаксом-50 (для удаления бромистого этидия) и G-75 (для обессоливания препаратов). ДНК элюировали с гидроксиапатита небольшим количеством 1 М К-фосфатного буфера, рН 6,8, а затем промывали колонку 10 мМ трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ NaCl и 0,5 мМ EDTA. Полученные таким образом фрагменты ДНК были пригодны для обработки эндонуклеазами рестрикции и пришивки линкера.

Фосфорилирование *Eco*RI-«линкера» *d* (GGAATTCC), присоединение его по обоим концам фрагментов ДНК и получение «липких» *Eco*RI-кон-

цов у фрагментов ДНК проводили по методу [25]. Реакционная смесь для получения гибридных ДНК содержала в 0,1 мл: 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 5 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 1 мМ АТФ, 1 мкг обработанной эндонуклеазой *EcoRI* ДНК плазмиды, 0,1 мкг соответствующего фрагмента ДНК с «липкими» *EcoRI*-концами и 10 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы. Полученные таким образом гибридные ДНК использовали для трансформации клеток *E. coli*.

Трансформацию клеток *E. coli* K12 HB101 и *E. coli* K12 KS 1366 проводили по модифицированному методу [26].

Селекцию клеток *E. coli* HB101, содержащих рекомбинантные плазмидные ДНК, проводили на чашках с 1,5% агаром на среде LB [9] с 25 мкг/мл ампициллина и 10 мкг/мл тетрациклина. Селекцию клеток *E. coli* KS1366, несущих рекомбинантные плазмидные ДНК, проводили на чашках с 1,5% агаром на среде ЭМС Левина [9] по появлению пурпурных колоний, при концентрации ампициллина 25 мкг/мл.

Выделение из клеток *E. coli* плазмидной ДНК. Культуры клеток, несущих рекомбинантные плазмиды, выращивали в 80 мл среды LB в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) до D_{500} 0,7. Затем добавляли хлорамфеникол до концентрации 200 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 15 ч при 37° С с аэрацией. Плазмидную ДНК выделяли щелочным методом [27] и дополнительно проводили колоночную хроматографию на биогеле А-15m. Для этого ДНК осаждали этанолом, растворяли в 200 мкл 100 мМ трис-НСl (рН 8,0), содержащего 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, наносили на колонку биогеля А-15m (25 мл) и элюировали ДНК тем же раствором. При хроматографии из препаратов ДНК удаляются остатки белков, основная масса РНК, большое количество поглощающих при 260 нм низкополимерных продуктов и соли.

Анализ рекомбинантных плазмидных молекул ДНК на включение соответствующих фрагментов и их копияность проводили путем обработки ДНК рестриктазой *EcoRI* при лимитирующей и достаточной для полного гидролиза концентрациях фермента. Полученные фрагменты метили по 3'-концам [α -³²P]dATP с помощью ДНК-полимеразы I *B. subtilis* и разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле [13].

Определение уровня Tc^R-клеток *E. coli* на среде с тетрациклином.

Из 50 колоний трансформированных клеток для каждой рекомбинантной плазмиды делали пересев на три параллельные чашки с агаром, содержащим возрастающие концентрации тетрациклина с интервалом в 5 мкг/мл. За максимальную для выживаемости клеток концентрацию тетрациклина принимали ту, при которой выросло 70–80% изучаемых клонов.

Клеточные экстракты для определения галактокиназной и трансферазной активностей получали следующим образом. Клетки, несущие индивидуальные молекулы рекомбинантной плазмидной ДНК, выращивали в 25 мл среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) до мутности D_{500} 0,7, охлаждали, осаждали центрифугированием и промывали физиологическим раствором. Осадки суспендировали в 1,8 мл раствора, содержащего 0,1 М трис-НСl (рН 7,8), 7,5 мМ EDTA, 5 мМ дитиотреит, к суспензии добавляли по 0,6 мг лизоцима в 0,2 мл того же раствора, перемешивали и инкубировали 15 мин при 0° С. Затем лизаты обрабатывали ультразвуком при 22 КГц (прибор УЗДН-1) на максимальной мощности по 5 с в ледяной бане и центрифугировали 15 мин при 14 000 об/мин и 4° С.

Галактокиназную активность в клеточных экстрактах определяли по превращению [¹⁴C]галактозы в [¹⁴C]галактозо-1-фосфат по методу [28], а уридилтрансферазную активность — по превращению [¹⁴C]галактозо-1-фосфата в [¹⁴C]уридилдифосфатгалактозу по методу [29].

Активность ферментов определяли в грубых экстрактах трех клонов каждой рекомбинантной плазмиды; из каждого грубого экстракта брали по три параллельные пробы. Активность ферментов в грубых экстрактах клеток, содержащих плазмиду с природным промотором *gal*-оперона, принимали за 100%.

Определение копияности плазмид. Меченные [³H] тимидином клетки получали по методу [30]. Хромосомную и плазмидную ДНК из меченых

клеток выделяли по методу [14]. Меченые ДНК разделяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Полосы, содержащие хромосомную и плазмидную ДНК, вырезали, определяли их радиоактивность и подсчитывали число копий плазмид, как описано [31].

Первичную структуру фрагментов ДНК определяли по методу Максама — Гилберта, содержание белка — по методу [32], ДНК — по методу [33].

Конструирование штамма. E. coli KS 1366Δgal, recA. Исходный штамм *E. coli* KS5ΔgalTc^srecA⁺ трансдуцировали фагом PI_{wir}, предварительно размноженным на штамме *E. coli* NK6659recA⁻Tc^R, у которого в *srl*-опероне находится вставка Tn10. *srl*-оперон тесно сцеплен с геном *recA*. По литературным данным [34], частота котрансдукции *tet*-маркера и гена *recA* составляет около 50%. На полноценной среде с тетрациклином (25 мкг/мл) отбирали Tc^R-клоны, из которых после двукратной очистки на селективной среде отбирали клетки, чувствительные к УФ-облучению. Полученный штамм обозначен как *E. coli* KS1366. Трансдукцию и пенициллиновую селекцию проводили стандартными методами [9].

Авторы выражают благодарность Е. В. Нечаевой за ценные советы и практическую помощь в конструировании штамма *E. coli* KS1366, а также В. А. Ефимову и О. Г. Чахмахчевой за предоставление синтезированного ими октануклеотидного *EcoRI*-линкера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Clements J. B., Sinsheimer R. L. J. Virology, 1975, v. 15, № 1, p. 151–160.
2. Hayashi Y., Hayashi M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1970, v. 35, p. 171–174.
3. Smith L. H., Sinsheimer R. L. J. Mol. Biol., 1976, v. 103, № 4, p. 699–710.
4. Kapitzka E. L., Stukacheva E. A., Shemyakin M. F. FEBS Lett., 1979, v. 98, № 1, p. 123–127.
5. Denhardt D. T. In: Comprehensive virology / Eds Fraenkel-Conrat H., Wagner R. N. Y.: Plenum Press, 1977, v. 7, p. 1–104.
6. Shine J., Dalgarno L. Nature, 1975, v. 254, № 5495, p. 34–38.
7. Rodriguez R. L., West R. W., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. Nucl. Acid. Res., 1979, v. 6, № 10, p. 3267–3287.
8. Stuber D., Vujard H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 167–171.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976.
10. Sanger F., Coulson A. R., Friedman T., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Fiddes J. C., Hutchison C. A., Slocombe P. M., Smith M. J. Mol. Biol., 1978, v. 125, № 2, p. 225–246.
11. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимов Т. Г., Онищенко А. И., Плетнев А. Г., Мигина Ю. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 840–847.
12. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г., Долганов Г. М., Ревердатто С. В. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1682–1692.
13. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
14. Shepard H. M., Polsky B. In: Methods in Enzymol. / Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 68, p. 503.
15. Bolivar H. W., Rodriguez R. L., Bellach M. C., Boyer H. W. Gene, 1977, v. 2, № 1, p. 75–93.
16. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 1, p. 247–254.
17. Gass K. B., Cozzarelli N. R. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 22, p. 7688–7700.
18. Smith H. O., Wilcox K. W. J. Mol. Biol., 1970, v. 51, № 2, p. 379–391.
19. Greene J. G., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodriguez R. L., Bellach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. Nucl. Acid. Res., 1978, v. 5, № 7, p. 2373–2380.
20. Efstratiadis A., Vournakis J. N., Donis-Keller H., Chaconas G., Dougal D. K., Kafatos F. C. Nucl. Acid. Res., 1977, v. 4, № 12, p. 4165–4174.
21. Стукачева Е. А., Каница Е. Л., Шемьякин М. Ф. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 891–902.
22. McDonnell M. W., Simin M. N., Studier F. W. J. Mol. Biol., 1977, v. 110, № 1, p. 119–146.
23. Studier F. W. J. Mol. Biol., 1973, v. 79, № 2, p. 237–248.
24. Tabak H. F., Flavell R. A. Nucl. Acid Res., 1978, v. 5, № 7, p. 2321–2332.
25. Howard By., Goodman M., McDonald R. J. In: Methods in Enzymol. / Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 68, p. 75–90.
26. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 8, p. 2110–2114.
27. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 4, p. 1513–1523.

28. Chacko C. M., McCrone L., Nadler H. L. *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 284, № 2, p. 552-555.
29. Merrill C. R., Geier M. R., Petricciani J. C. *Nature*, 1971, v. 233, № 5319, p. 398-400.
30. West R. W., Neve R. L., Rodriguez R. L. *Gene*, 1979, v. 7, № 3/4, p. 271-288.
31. Weisblum B., Graham M. Y., Gryczan T., Dubnau D. J. *Bacteriol.*, 1979, v. 137, № 1, p. 635-643.
32. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 72, № 1, p. 248-254.
33. Спирин А. С. *Биохимия*, 1958, т. 23, № 3, с. 656-661.
34. Klecknev N., Roth J., Botstein D. J. *Mol. Biol.*, 1977, v. 116, № 1, p. 125-159.

Поступила в редакцию
21.IV.1982
После доработки
26.V.1982

COMPARATIVE STUDIES OF THE THREE MAJOR BACTERIOPHAGE ϕ X174
PROMOTERS CONTROLLING THE EXPRESSION OF *tet* AND *gal* GENES IN
E. COLI CELLS

FEDCHENKO V. I., DOLGANOV G. M., AKOPIANTS N. S.,
CHESTUKHIN A. V., SHEMYAKIN M. F.

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

Three major phage ϕ X174 promoters A, B and D, the promoters G2 of phage fd and *lac* UV5 of *E. coli* were cloned on the plasmids pBR H4 and pHD 68-17 in order to determine the extent of *gal* and *tet* gene expression in vivo under the control of these promoters. The comparative studies were carried out with the use of recombinant plasmids, which carry the cloned promoters in the place of natural *gal* (pHD 68-17) or *tet* (pBR H4) ones. A comparative promoter strength was evaluated by the level of Tc-resistance of *E. coli* cells bearing the recombinant pBR H4 plasmids or by the extent of *gal* operon enzyme activity in crude cell extracts. It was shown that all the three major ϕ X174 promoters can efficiently provide the expression of *tet* and *gal*-operon genes in vivo. The strongest of the ϕ X174 promoters was found to be the D promoter.