



УДК 547.963.32.04:577.11

КОНСТРУИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА ВЕКТОРА
ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ПРОМОТОРСОДЕРЖАЩИХ
ФРАГМЕНТОВ ДНК. КЛОНИРОВАНИЕ
ПРОМОТОРОВ *E. COLI* И БАКТЕРИОФАГА T7

Серпинский О. И., Гаргина Е. А., Микрюков П. Н.,
Кравченко В. В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, Новосибирск

Зайчиков Е. Ф., Максимов Т. Г., Онищенко А. И.,
Плетнев А. Г.

Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

Митина Ю. Л.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

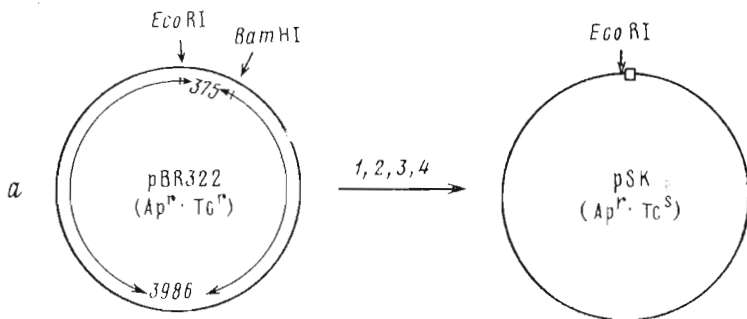
На основе плазмиды pBR322 *in vitro* сконструирован новый вектор pSK в результате удаления короткого *AluI*-фрагмента (15 пар оснований) из промоторной области *tet*-гена, обеспечивающего устойчивость клеток *E. coli* к тетрациклину (Tc^r). Новая делеционная плазида pSK в отличие от pBR322 не обладает фенотипом Tc^r . Клонирование промоторсодержащих фрагментов ДНК в составе pSK по сайту *EcoRI* приводило к восстановлению фенотипа Tc^r , если направление транскрипции фрагмента совпадало с ориентацией *tet*-гена. С помощью нового вектора pSK произведено клонирование *BspI*-, *MspI*- и *AluI*-фрагментов ДНК, содержащих UV5-промотор *lac*-оперона *E. coli* и промотор λ_2 бактериофага T7. Во всех случаях промоторсодержащие фрагменты могут быть выделены после расщепления рекомбинантных ДНК эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*.

Плазида pBR322 [1] широко используется как вектор в экспериментах по геной инженерии. На основе данной плазмиды создан ряд векторов для клонирования промоторсодержащих фрагментов ДНК [2-4]. При конструировании таких векторов в результате делеции [4] или замены [2] функционально важных участков внутри промоторной области *tet*-гена, обеспечивающего устойчивость клеток *E. coli* к тетрациклину (Tc^r), происходило либо полное выключение экспрессии гена, либо значительное снижение Tc^r . Клетки *E. coli*, несущие такие модифицированные плазмиды, выживают в среде с содержанием тетрациклина до 5 мкг/мл, тогда как pBR322 обеспечивает Tc^r до 75 мкг/мл.

Для выяснения структурно-функциональных взаимоотношений в промоторах значительный интерес представляет изучение экспрессии *tet*-гена в зависимости от различных делеций и модификаций ДНК в области промотора p_{Tc} .

В настоящей работе на основе плазмидного вектора pBR322 в результате удаления из p_{Tc} короткого *AluI*-фрагмента ДНК (15 п.о.*) *in vitro* создан новый вектор pSK. Удаленный фрагмент картируется между двумя сайтами узнавания промотора РНК-полимеразой *E. coli* (рис. 1). В процессе конструирования эти сайты остаются незатронутыми. Одновременно в работе была изучена возможность применения делеционной плазмиды pSK в качестве вектора для клонирования промоторсодержащих фрагментов ДНК.

* п.о. — пар оснований.



б

... GAATTCTCAT GTTTGACAGC TTATCATCSA TAAGCTTTAA TCGGCTAGTT TATCACAGTT... (pBR322)

... GAATTCTCAT GTTTGACAGC TTTAATGCGG TAGTTTATCA CAGTTAAATT GCTAACCAG... (pSK)

Рис. 1. Конструирование и свойства плазмиды pSK. а — схема конструирования *in vitro* pSK. Цифрами 1–4 обозначена последовательность операций: 1 — расщепление ДНК pBR322 эндонуклеазами *EcoRI*+*Bam*HI и выделение фрагментов 375 и 3986 электрофорезом в агарозном геле; 2 — гидролиз фрагмента 375 рестриктазой *Alu*I; 3 — лигирование фрагмента 3986 с продуктами *Alu*I-гидролизата фрагмента 375; 4 — трансформация клеток *E. coli* и отбор *Tc*^s-колоний. б — первичная структура ДНК в окрестности *p*_{Tc} у плазмид pBR322 [5] и pSK (по данным рис. 2). Сплошной линией подчеркнуты участки узнавания промотора РНК-полимеразой *E. coli* [20]. Прерывистой линией отмечена последовательность нуклеотидов ДНК pBR322, отсутствующая в ДНК pSK

Схема конструирования делеционной плазмиды приведена на рис. 1а. Селекцию клонов, содержащих плазмиду pSK, проводили по потере устойчивости (*Tc*^s) к высокой концентрации тетрациклина (20 мкг/мл). В результате было отобрано несколько колоний с фенотипом *Ap*^r, *Tc*^s. Для подтверждения того, что данный фенотип обусловлен делецией в плазмидной ДНК, была выделена ДНК одного из клонов и проведен анализ ее первичной структуры в районе *p*_{Tc} (рис. 2). Из рис. 2 и 1б следует, что делеция картируется между двумя *Alu*I-сайтами на pBR322 и имеет длину 15 п.о. Мы обозначили эту делеционную плазмиду pSK. Анализом с помощью эндонуклеаз рестрикции показано, что *Bsp*I-фрагменты ДНК pBR322 и pSK полностью совпадают по электрофоретической подвижности, однако в гидролизате ДНК pSK вместо фрагмента *Bsp*I-192 (цифра обозначает длину фрагмента в парах оснований) появляется фрагмент *Bsp*I-177, что согласуется с взаиморасположением *Bsp*I- и *Alu*I-сайтов на ДНК pBR322 [5]. Данные рестриционного анализа и анализ первичной структуры ДНК свидетельствуют о том, что структура ДНК плазмиды pSK отличается от структуры pBR322 только делецией 15 п.о., картируемой в области *p*_{Tc}.

Известно, что нарушения структуры ДНК pBR322 в районе сайта узнавания *Hind*III влияют на экспрессию гена *tet* [1–4]. Поэтому необходимо было проверить влияние делеции в ДНК pSK на активность гена *tet*. С этой целью изучали зависимость роста клеток *E. coli*, несущих плазмиду pSK, от концентрации тетрациклина в среде. Из рис. 3 видно, что уровни устойчивости к тетрациклину у клеток *E. coli* С600 и *E. coli* С600 (pSK) практически не различаются. Следовательно, в плазмиде pSK ген *tet* инактивирован, возможно, в результате нарушения инициации транскрипции с промотора. Однако делеция в ДНК pSK не затрагивает мест узнавания промотора РНК-полимеразой *E. coli* (см. рис. 1). Естественно возникает вопрос: способна ли РНК-полимераза специфически взаимодействовать с модифицированным участком *p*_{Tc} в плазмиде pSK?

На рис. 4 приведена электрофореграмма фрагментов ДНК pSK, образующих комплексы с РНК-полимеразой *E. coli*. Эти фрагменты были получены методами А и Б [6] из *Bsp*I+*Eco*RI-гидролизата ДНК. Из данных,

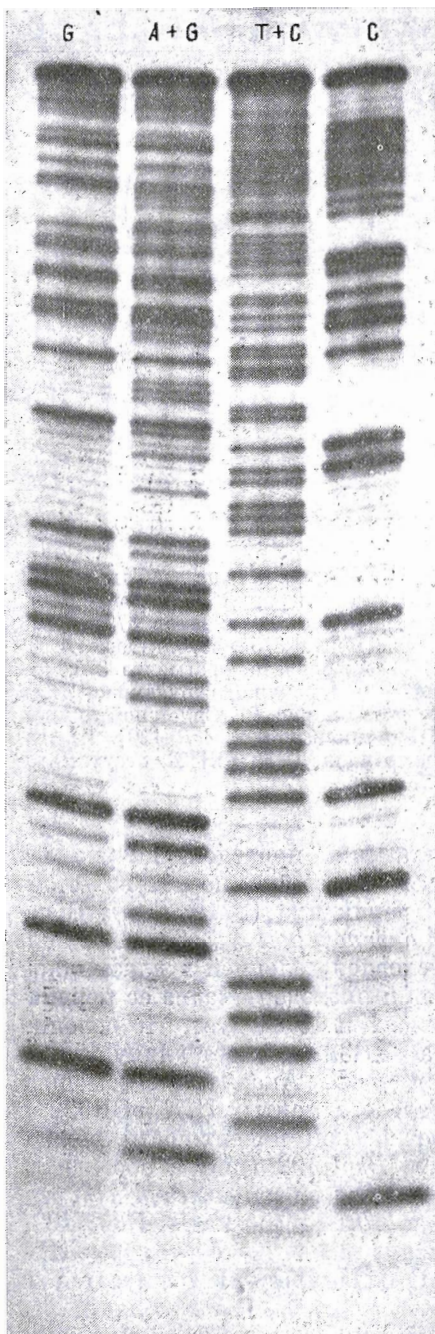


Рис. 2

Рис. 2. Анализ первичной структуры ДНК-фрагмента *EcoRI*+*BspI*-159 из ДНК рСК по Максаму – Гилберту. ³²P-метка введена во фрагмент по *EcoRI*-концу с помощью ДНК-полимеразы I (см. «Экспер. часть»)

Рис. 3. Кривые роста клеток *E. coli* С600, содержащих (а) или не содержащих (б) плазмиду рСК, в зависимости от концентрации тетрациклина в среде. Цифры 0, 2, 4, 6 и 8 обозначают концентрацию антибиотика в среде (мкг/мл),

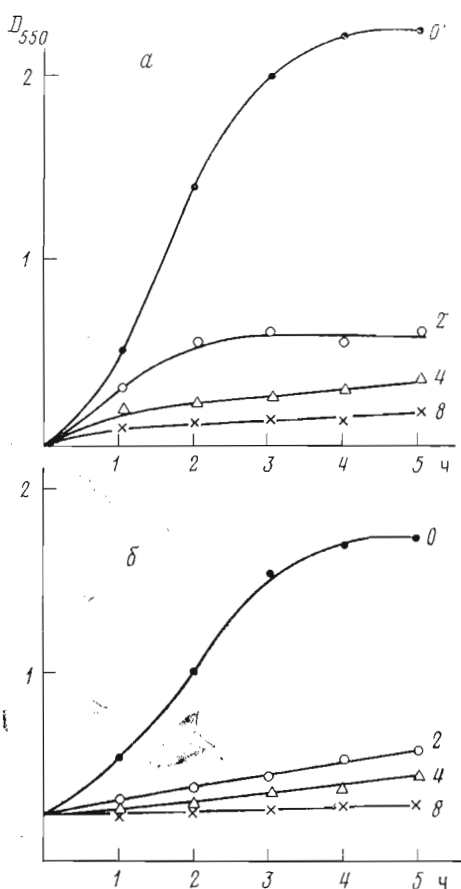


Рис. 3

представленных на рис. 4 (дорожки 2 и 3), следует, что при выделении фрагментов ДНК по методу А РНК-полимераза связывается с фрагментом *BspI*-177, а при использовании метода Б связывание происходит с фрагментом 159 (рис. 4). Связывание РНК-полимеразы с другими фрагментами в данной работе не рассматривается. Связывание фрагмента *BspI*-177 свидетельствует о том, что РНК-полимераза взаимодействует с участком ДНК рСК, расположенным в окрестности сайта *EcoRI*, и защищает его от действия эндонуклеазы *EcoRI*. Этот сайт *EcoRI* не защищается РНК-полимеразой на ДНК рBR322 в данных условиях. Следовательно, модифицированный участок *p_{тс}* ДНК рСК сохраняет способность к связыванию РНК-полимеразы *E. coli*. С другой стороны, связывание фрагмента 159 (рис. 4, до-

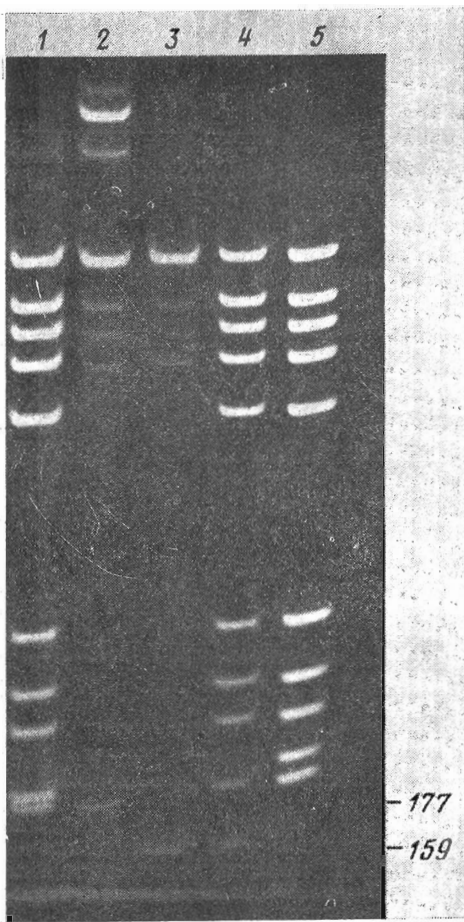


Рис. 4

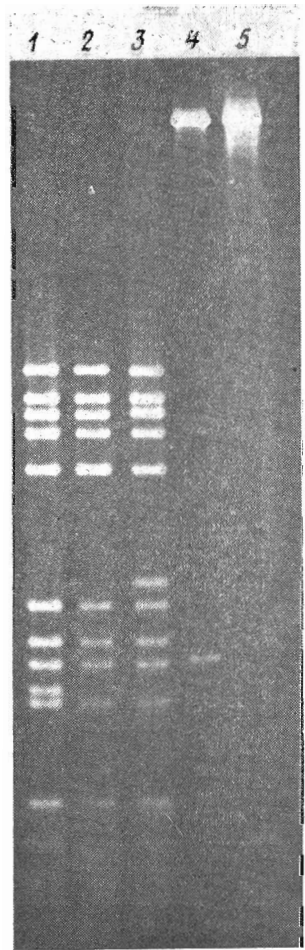


Рис. 5

Рис. 4. Электрофоретическое разделение *EcoRI*+*BspI*-гидролизата ДНК рСК (дорожка 4) и связывающих РНК-полимеразу фрагментов, выделенных из этого гидролизата методами А (дорожка 2) и Б (дорожка 3). Дорожки 1 и 5 — *BspI*-фрагменты ДНК рСК и рВВ322 соответственно. Условия электрофореза см. «Экспер. часть»

Рис. 5. Электрофоретическое разделение гидролизатов ДНК плазмид: 1, 2 и 3 — *BspI*-фрагменты рВВ322, рСК-203 и рСК-95 соответственно; 4, 5 — *EcoRI*-фрагменты рСК-203 и рСК-95 соответственно. Условия электрофореза см. рис. 4

дорожка 3) может быть следствием того, что внутри этого фрагмента есть дополнительные места связывания РНК-полимеразы. Детальное изучение этих вопросов представляет самостоятельный интерес и будет предметом отдельного сообщения.

Далее нами была проверена возможность использования плазмиды рСК в качестве вектора для клонирования промоторсодержащих фрагментов ДНК. Для этого ДНК рСК гидролизовали эндонуклеазой рестрикции *EcoRI* и после достраивания ДНК-полимеразой I «липких» *EcoRI*-концов лигировали с промоторными фрагментами *BspI*-203 и *AluI*-95, содержащими UV5-промотор (*p_{lacUV5}*) лактозного оперона *E. coli*. Отбор клонов, несущих рекомбинантные ДНК, проводили на чашках со средой, содержащей X-gal и тетрациклин (20 мкг/мл). Анализ структуры рекомбинантных ДНК рСК-203 и рСК-95, выделенных из колоний с таким фенотипом (Lac, Tc^r), проводили с помощью эндонуклеаз рестрикции *BspI* и *EcoRI*. Из данных рестрикционного анализа (рис. 5) следует, что ДНК рСК-203 и рСК-95 содержат вставки, которые отделяются от векторной ДНК при гидролизе *EcoRI*. В случае плазмиды рСК-95 была определена структура в окрест-

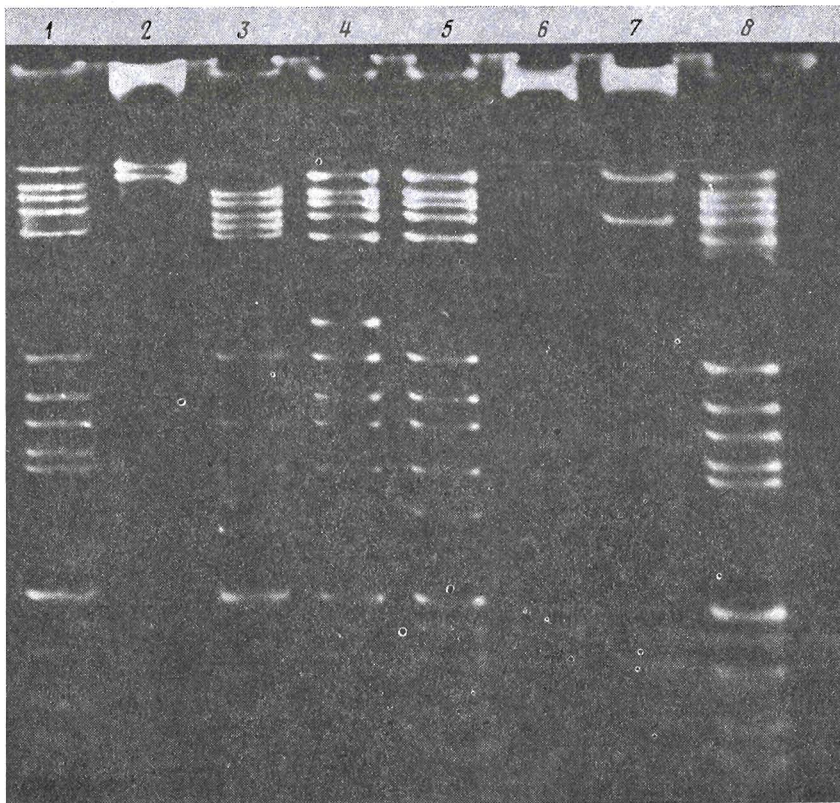


Рис. 6. Рестрикционный анализ плазмиды pSK-A₂T7. Дорожки 1 и 8 – контрольный: *BspI*-гидролизат ДНК pBR322. Дорожки 2–7 – гидролизаты ДНК pSK-A₂T7, полученные в результате обработки ДНК следующими эндонуклеазами рестрикции: *HindII*, *HindII+BspI*, *BspI*, *BspI+EcoRI*, *EcoRI* и *EcoRI+HindII*. Электрофорез продуктов расщепления ДНК проводили в 4% полиакриламидном геле, содержащем 0,05 М трис-боратный буфер, pH 8,3

```

      10      20      30      40      50      60
  LAATCGGATAAGTAGACAGCCTGATAAGTCCGACGAAAAACAGGTAATTGGACAACATGAAGTAAACATG
    GCCTATTCATCTGTCCGGASTATTCAGCGTGCTTTTGTGCCATAAAGTGTGTACTTCATGTGAC

      70      80      90      100     110
  CAGTAAAGATACAAATCGCTAGGTAACASTAGCAGCGTCAACCG
  GTCATTCATGTTTAGCGATCCATGTGTGATCGTCCGAGTTGGCTAA
  
```

Рис. 7. Нуклеотидная последовательность фрагмента *EcoRI*-110, выделенного из *EcoRI*-гидролизата ДНК pSK-A₂T7. Стрелкой обозначено место инициации транскрипции с промотора A₂ [9, 10]. Участки узнавания промотора РНК-полимеразой *E. coli* подчеркнуты

ности сайтов *EcoRI*. Эти результаты показали, что ориентация промотора *p_{lacUV5}* в ДНК pSK-95 совпадает с направлением ориентации гена *tet*.

По аналогии с промоторсодержащими фрагментами *BspI*-203 и *AluI*-95 в плазмиду pSK был встроены промоторный фрагмент ДНК фага T7, содержащий промотор A₂ (фрагмент *MspI*-104). Из рис. 6 видно, что вставка в ДНК pSK-A₂T7 имеет ожидаемую длину (около 110 п.о.). Первичная структура этой вставки была определена (рис. 7) и полностью совпала с первичной структурой промотора A₂ ДНК фага T7 [7, 8]. Наличие *HindII*-сайта во фрагменте-вставке (рис. 7) использовали для определения ориентации промотора A₂ относительно гена *tet* в плазмиде. Электрофоретический анализ *HindII*-гидролизата ДНК pSK-A₂T7 показал (рис. 6), что промотор A₂ ориентирован в направлении гена *tet*.

Тот факт, что плазида рSK-A₂T7 обеспечивает клеткам *E. coli* устойчивость к тетрациклину, однозначно свидетельствует о том, что промотор A₂ функционирует в плазмиде *in vivo*. В системе транскрипции *in vitro* было обнаружено, что при использовании фрагмента *EcoRI*-110 в качестве матрицы синтезируется специфическая РНК длиной около 30 нуклеотидных остатков. Это совпадает с предполагаемой длиной для этой РНК, определенной на основании первичной структуры фрагмента-матрицы (рис. 7) и известного положения места инициации транскрипции мРНК с промотора A₂ [9, 10]. Таким образом, плазида рSK-A₂T7 может служить источником индивидуального промоторного фрагмента, способного к специфической инициации транскрипции *in vitro* в системе, содержащей РНК-полимеразу *E. coli*.

Из совокупности приведенных выше данных следует, что ДНК рSK можно использовать как вектор для клонирования промоторных фрагментов. Следует особо отметить, что сайт *EcoRI* в ДНК рSK защищается в присутствии РНК-полимеразы от действия рестриктазы. Поэтому можно удалять дальний (считая от начала гена *tet*) сайт *EcoRI* в плазмидах типа рSK-203, рSK-95 и рSK-A₂T7, что открывает возможности для использования этих плазмид в качестве векторов для клонирования генов, у которых отсутствует свой промоторный участок.

Экспериментальная часть

Плазмидную ДНК выделяли по методу [11]. ДНК фага λ plac5-I L8UV5 (штамм получен от Э. Г. Малыгина, ВНИИ МБ, Новосибирск) выделяли как описано ранее [12]. Эндонуклеазы рестрикции *BspI*, *EcoRI*, *BamHI*, *MspI* и *AluI* выделяли по методу [13]. Высокоочищенный препарат РНК-полимеразы *E. coli* был выделен комбинированным методом на основе [14, 15]. Препарат ДНК-лигазы фага T4 (8 ед. акт./мкл) был любезно предоставлен А. С. Гилевым (ВНИИ МБ, Новосибирск). Активность фермента приводится по [16]. Препарат ДНК-полимеразы I *E. coli* был получен от В. Н. Потапова (ИЦиГ СО АН СССР). Он обладал активностью 2 ед. акт./мкл [17].

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции (см. выше) и выделение промоторных фрагментов ДНК, образующих комплексы с РНК-полимеразой, проводили как описано ранее [6] (мольное соотношение ДНК рSK и РНК-полимеразы *E. coli* было 1:5). Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 4% полиакриламидном геле [12]. Для выделения фрагментов ДНК из геля использовали метод электрооэлюзии [18]. Гели окрашивали и фотографировали как описано ранее [12].

Для получения плазмиды рSK (рис. 1) к 1 мкг *AluI*-гидролизата ДНК-фрагмента 375 в буфере 1, содержащем 20 мМ трис-HCl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, добавляли 1 мкг ДНК-фрагмента 3986, АТФ до концентрации 5·10⁻⁴ М и 1 мкл ДНК-лигазы (конечный объем 10 мкл) и инкубировали 12 ч при 10° С. Полученной смесью трансформировали [19] клетки *E. coli* HB101 и высевали на чашки с LB-агаром, содержащим 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 1,8% агара и 40 мкг/мл ампициллина (эффективность трансформации составляла около 10⁴ колоний на 1 мкг ДНК-вектора). Трансформанты, содержащие плазмиду рSK, отбирали по чувствительности к тетрациклину, перекалывая на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин (40 мкг/мл) и тетрациклин (20 мкг/мл).

Для получения плазмиды рSK-203 к 1 пмоль фрагмента *BspI*-203 из ДНК λ plac5-IL8UV5 [6], содержащего промотор *placuv5* [20], добавляли 0,2 пмоль *EcoRI*-гидролизата ДНК рSK (*EcoRI*-концы были предварительно достроены ДНК-полимеразой I в присутствии 10⁻⁴ М dATP и TTP) и инкубировали с 8 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 в условиях, указанных выше. Трансформацию проводили как описано ранее, клетки высевали на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин (40 мкг/мл) и тетрациклин (20 мкг/мл). Аналогично были получены плазмиды рSK-95 (содержит промотор *placuv5* в составе фрагмента *AluI*-95 из ДНК рSK-203, выделен-

ного по [6]) и рSK-A₂T7 (содержит промотор A₂ ДНК фага T7, выделенный из *Msp*I-гидролизата фрагмента *Bsp*-1400 [21]).

Первичную структуру фрагментов ДНК определяли по методу Максама — Гилберта [22].

Транскрипцию фрагментов ДНК *in vitro* проводили в условиях, указанных в работе [6], но без добавления гепарина. Полученные РНК анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле, приготовленном на 0,05 М трис-боратном буфере, рН 8,3, с 7 М мочевиной. Положение полос РНК на геле определяли радиоавтографией. Для определения длин РНК в качестве маркера использовали *Haе*III-гидролизат ДНК фХ174 [6] и меченный ³²P по 5'-концу олигонуклеотид длиной 22 нуклеотидных остатка.

Определение устойчивости плазмид к тетрациклину проводили по методу [23].

ЛИТЕРАТУРА

1. Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. L., Betlach M. C., Heyneker H. L., Boyer H. W., Crossa J. H., Falkow S. *Gene*, 1977, v. 2, № 2, p. 95–113.
2. West R. W., Neve R. L., Rodriguez R. L. *Gene*, 1979, v. 7, № 3/4, p. 271–288.
3. Widera G., Gautie F., Lindermaier W., Collins J. *Mol. Gen. Genet.*, 1978, v. 163, № 3, p. 301–305.
4. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Чувпило С. А., Северцова И. В., Шингарова Л. Н., Колосов М. Н. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 2, с. 309–311.
5. Sutcliffe I. G. *Nucl. Acids Res.*, 1978, v. 5, № 8, p. 2721–2728.
6. Кравченко В. В., Vassilenko S. K., Grachev M. A. *Gene*, 1979, v. 7, № 3/4, p. 181–195.
7. Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 8, с. 1132–1134.
8. Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 12, с. 1692–1694.
9. Pribnow D. *J. Mol. Biol.*, 1975, v. 99, № 3, p. 419–443.
10. Pribnow D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, № 3, p. 784–788.
11. Guerry P., Le Blanc D. J., Falkow S. *J. Bacteriol.*, 1973, v. 116, № 4, p. 1064–1066.
12. Кравченко В. В., Василенко С. К., Гилева И. П., Зайцев Б. Н. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 2, с. 217–222.
13. Негесов С. В., Грачев С. А. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 5, с. 790–791.
14. Burgess R. R., Jendrisak J. J. *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 21, p. 4634–4638.
15. Gonzales N., Wiggs J., Chamberlin M. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, v. 182, № 2, p. 404–408.
16. Weiss B., Jacquemin-Sabson A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. *J. Biol. Chem.*, 1968, v. 243, № 17, p. 4543–4555.
17. Richardson C. C., Schidkraut C. L., Aposhian H. V., Kornberg A. *J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, № 1, p. 222–232.
18. McDonnell M. W., Simon M. N., Studier F. W. *J. Mol. Biol.*, 1977, v. 110, № 1, p. 119–146.
19. Hershfield V., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinski D. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, № 9, p. 3455–3459.
20. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. *Cell*, 1980, v. 20, № 1, p. 269–281.
21. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. *Докл. АН СССР*, 1978, т. 239, № 2, с. 475–478.
22. Maxam A. M., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
23. Tait R. C., Rodriguez R. L., Boyer H. W. *Mol. Gen. Genet.*, 1977, v. 151, № 3, p. 327–331.

Поступила в редакцию
11.XII.1981

CONSTRUCTION AND PROPERTIES OF THE VEHICLE FOR CLONING THE
PROMOTER-CONTAINING DNA FRAGMENTS. THE CLONING OF *E. COLI*
AND PHAGE T7 PROMOTERS

SERPINSKI O. I., KARGINOVA E. A., MIKRYUKOV N. N.,
KRAVCHENKO V. V., ZAYCHIKOV E. F., MAXIMOVA T. G.,
ONIKIENKO A. I., PLETNEV A. G., MITINA Yu. L.

*All-Union Institute of Molecular Biology, Novosibirsk; Novosibirsk
Institute of Organic Chemistry and Institute of Cytology and
Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A 15 b.p. nucleotide *AluI* fragment was removed from the region of the tetracycline promoter (p_{Tc}) of the pBR322 plasmid. This deletion interferes with the in vivo function of the p_{Tc} promoter – the plasmid obtained (named pSK) fails to provide the *E. coli* cells with the resistance to tetracycline. This ability may be recovered if a promoter fragment is introduced into pSK using its *EcoRI* site in such a way that transcription proceeds towards the *tet* gene. This property of the pSK plasmid was exploited for cloning the *BspI*-, *MspI*- and *AluI*-fragments, which contained *lacUV5* promoter of *E. coli* and A2 promoter of T7 phage. In all cases introduction of the promoter fragments was accomplished in such a way that the GAATTC sequence was recovered at the points of ligation. Due to this, the promoter fragments could be easily released from the pSK after *EcoRI* digestion.