



УДК 577.023

Л. Г. Глушакова, О. Р. Романовская, В. А. Кордюм

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАННЕГО И ПОЗДНЕГО ПРОМОТОРОВ ФАГА T7 ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ В *ESCHERICHIA COLI*

Создана модельная система, позволяющая сравнить эффективность использования раннего и позднего промоторов фага T7 для экспрессии β -галактозидного гена *E. coli*.

Избрана следующая стратегия конструирования. Ген РНК-полимеразы фага T7 клонирован в составе ДНК векторного фага λ . Модельный ген *z lac-оперона E. coli* (*EcoRI-SalI*-фрагмент pLZ56) клонирован в составе ДНК коммерческой плазмиды GEM-1 фирмы «Promega» (USA), содержащей поздний промотор фага T7. В клонированном фрагменте сохранены сайты связывания с рибосомами и промотор A3, ранний промотор фага T7, специфичный для РНК-полимеразы *E. coli*.

Приведены закономерности синтеза β -галактозидазы при транскрипции *z*-гена как с позднего промотора фага T7, так и с промотора A3.

Использование высокоспецифичной полимеразы фага T7 позволяет осуществлять контролируемую экспрессию целевых генов [1, 2], что особенно существенно для эукариотических генов, продукты которых могут оказывать токсический эффект на клетки кишечной палочки. РНК-полимераза фага T7 узнает только поздние промоторы фага T7, содержащие строго консервативные последовательности ДНК, отсутствующие у *E. coli* [3].

Нам представляется перспективным использование системы, предлагаемой авторами [1, 2], для получения продуктов некоторых эукариотических генов в *E. coli*, токсичных для нее и синтез которых можно обеспечить только в контролируемых условиях.

Занимаясь в перспективных целях вышеупомянутую систему, мы решили сравнить эффективность позднего промотора фага T7 и одного из сильных прокариотических промоторов — раннего промотора фага T7, — узнаваемого РНК-полимеразой *E. coli*, а также динамику накопления продукта целевого гена, экспрессируемого под контролем каждого из этих промоторов.

Предлагается два способа введения гена полимеразы фага T7 (ген 1) в клетку кишечной палочки: а) при инфекции рекомбинантным фагом λ , несущим ген 1 фага T7 [2]; б) введение гена 1 в составе ДНК многокопийной плазмиды [1].

Нами избран следующий путь конструирования векторной системы для контролируемой экспрессии в *E. coli*. Ген РНК-полимеразы фага T7 клонирован в составе ДНК векторного фага λ UV5L8 [4]. Полученный рекомбинантный фаг обозначили λ proT7. Целевой ген клонирован в составе векторной ДНК коммерческой плазмиды GEM-1 (фирма «Promega», USA). Векторная ДНК GEM-1 предназначена для транскрипционной системы *in vitro* и имеет полилинкерную область, расположенную вслед за поздним промотором фага T7 (рис. 1). Индукция транскрипции с P_{T7} осуществляется при инфекции GEM-1-трансформантов фагом λ proT7.

Источником гена 1 фага T7 служила плазида pAR1219, содержащая маркерный ген *bla* [5]. ДНК плазмиды pAR1219 гидролизовали рестриктазой *EcoRI* и лигировали эту полноразмерную плазмидную ДНК с ДНК векторного фага λ , расщепленной по этому же сайту.

Отбор рекомбинантных фагов проведен по наличию признака, кодируемого геном *bla* (β -лактамазная активность). Наличие РНК-полимеразной активности в фаголизатах определяли, используя транскрипционную систему *in vitro* [6].

В качестве модельного гена был избран *z*-ген *lac*-оперона *E. coli*, так как его продукт (β -галактозидаза) легко тестируется и достаточно стабилен в клетках кишеч-

ной палочки [7]. Источником z -гена служила плазмида $pLZ56$ (рис. 1), любезно предоставленная В. Г. Коробко. Учитывая, что векторная плазмид $GEM-1$ предназначена для транскрипции *in vitro*, в полилинкерную область под контролем P_{T7} был клонирован $EcoRI$ - $SalI$ -фрагмент $pLZ56$, содержащий помимо z -гена также последовательность Шайна-Далгарно. В этом фрагменте сохранен ранний промотор фага $T7$, специфичный для РНК-полимеразы $E. coli$ (обозначен $A3$).

При литической инфекции $GEM-1$ - z -трансформантов фагом λ po1T7 обнаружено, что содержание β -галактозидазы в первые 4 ч после заражения резко увеличивается, а затем синтез фермента прекращается (рис. 2, кривая 1). В этом случае экспрессия

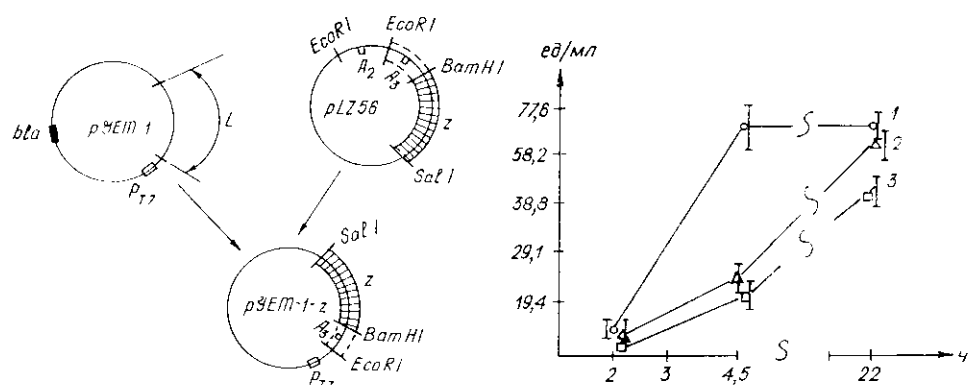


Рис. 1. Схема конструирования гибридной плазмиды $GEM-1-z$: L — полилинкерная область, содержащая уникальные сайты для 13 рестриктаз; A_2 и A_3 — ранние промоторы фага $T7$, узнаваемые РНК-полимеразой $E. coli$; z — структурный ген β -галактозидазы; P_{T7} — поздний промотор фага $T7$, специфичный для РНК-полимеразы фага $T7$

Fig. 1. Scheme of construction of hybrid plasmid $GEM-1-z$: L — polylinker region containing 13 unique restriction enzyme recognition sites; A_2 and A_3 — early promoters of $T7$ phage recognized by $E. coli$ RNA-polymerase; z — a structural gene of β -galactosidase; P_{T7} — a late promoter of phage $T7$, specific for phage $T7$ RNA-polymerase

Рис. 2. β -галактозидазная активность в культуре $JM103_{\Delta lac} GEM-1-z$ при инфекции фагами λ po1T7 (1), λ zUV5L8 (2), λ c1857 (3). Культуру аэрировали при 37°C в среде LB, содержащей ампициллин (20 мкг/мл). При достижении концентрации $\sim 10^8$ клеток/мл среду культуру инфицировали с множественностью 1—5 корпускул на клетку. В момент заражения вносили мальтозу до конечной концентрации 0,4% (масса/объем)

Fig. 2. β -galactosidase activity in $JM103_{\Delta lac} GEM-1-z$ culture infected by phages λ po1T7 (1), λ zUV5L8 (2), λ c1857 (3). The culture was aerated at 37°C in LB medium supplemented with 20 μ g/ml of ampicillin. When the cell concentration reached $\sim 1 \cdot 10^8$ cells/ml, the culture was infected with multiplicity of about 1-5 phage particle/cell. At this moment, maltose was added to a final concentration of 0.4% (w/v)

z -гена контролировалась P_{T7} . В отдельном эксперименте сравнивали характер экспрессии модельного гена под контролем как P_{T7} (рис. 2, кривая 1), так и A_3 (рис. 2, кривые 2 и 3) промоторов. Для полной идентификации условий эксперимента и для исключения влияния инфекции фагом на характер выражения z -гена при анализе экспрессии под контролем A_3 -промотора $GEM-1-z$ -трансформанты инфицировали фагами λ c1857 и λ zUV5L8.

Векторный фаг λ zUV5L8, использованный для клонирования гена РНК-полимеразы фага $T7$, содержит структурный ген β -галактозидазы. Ранее [8] нами показано, что фагозависимый синтез β -галактозидазы в клетках $E. coli$ при низких значениях множественности инфекции малоэффективен. Однако, чтобы исключить этот уровень синтеза β -галактозидазы и характеризовать только синтез, обеспечиваемый экспрессией гена z в составе $GEM-1-z$ под контролем промотора A_3 , мы использовали фаг λ c1857 (предоставлен В. Н. Рыбчинным, Ленинград, политехн. ин-т).

Все три варианта микробного синтеза β -галактозидазы рассматривали в одинаковых условиях (рис. 2). Отмечаем, что синтез β -галактозидазы, наблюдаемый при литической инфекции фагом λ po1T7 $GEM-1-z$ -трансформантов (транскрипция z -гена контролируется P_{T7}), осуществляется с большей скоростью (в первые 3—4 ч) и прерывается (лизисом клеток) значительно раньше (рис. 2, кривая 1), чем для двух других вариантов (рис. 2, кривая 2 — транскрипция z -гена контролируется промотором A_3 , кривая 3 — транскрипция z -гена контролируется как A_3 , так и $lacUV5$ промотором (в

составе ДНК фага λ). Весь эксперимент проведен со штаммом *E. coli* K12JM103Mac [9], в клетках которого вследствие делеции *lac*-области отсутствует синтез β -галактозидазы.

Как представлено на рис. 2 (кривая 1), при инфекции фагом λ .*polT7 GEM-1-z*-трансформантов, наблюдается активный синтез β -галактозидазы, прекращающийся через 4 ч после заражения.

Известно [2], что РНК-полимераза фага T7 активно конкурирует с РНК-полимеразой *E. coli*, причем настолько, что транскрибируются практически только гены под контролем P_{T7} . В таких условиях в клетках кишечной палочки, трансформированных *GEM-1* и инфицированных фагом λ .*polT7*, не происходит созревания фага. В наших условиях при использовании множественности инфекции в диапазоне 1—5 корпускул на клетку не все клетки популяции оказываются зараженными фагом λ .*polT7*. Незараженные исходно клетки продолжают делиться и уже не могут быть инфицированы потомством исходного (внесенного в культуру) фага *polT7* и, следовательно, в них отсутствует экспрессия целевого гена под контролем P_{T7} (рис. 2, кривая 1).

При заражении культуры клеток JM103 *GEM-1-z* фагами λ .*c1857* и λ .*zUV5L8* происходит их успешное размножение с последующей «реинфекцией» неинфицированной части клеточной популяции. Благодаря этому обстоятельству наблюдается увеличение уровня β -галактозидазной активности достаточно длительное время (рис. 2, кривые 2, 3). Этот подход приемлем для получения в *E. coli* нетоксичных для ее клеток и достаточно стабильных продуктов целевых генов [10, 11].

В последующей работе будет оценена возможность экспрессии в *E. coli* под контролем P_{T7} целевого эукариотического гена.

COMPARISON OF EFFICIENCY OF USE OF EARLY AND LATE PROMOTERS OF T7 PHAGE FOR β -GALACTOSIDASE GENE EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

L. G. Glushakova, O. R. Romanovskaya, V. A. Kordium

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The model system for comparison of the efficiency of use of early and late promoters of T7 phage for the β -galactosidase gene expression has been constructed.

The following strategy of construction has been chosen. The gene of T7 phage RNA-polymerase has been inserted into DNA of phage cloning vector. The model gene *z* of *lac* operon of *E. coli* (*EcoRI-SalI* digest of *pLZ56*) has been inserted into DNA of plasmid *GEM-1* (firm «Promega») which contains phage T7 late promoter. The cloned *pLZ56* fragment of DNA contains also S-D sites and *A3* promoter specifically recognized by *E. coli* RNA-polymerase. Some features of β -galactosidase synthesis during transcription of the *z* gene under the control of the late promoter of phage T7 and under the control of *A3* promoter are shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tabor J., Richardson C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 6.— P. 1074—1078.
2. Studier W., Moffatt B. Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // J. Mol. Biol.— 1986.— 189, N 1.— P. 113—130.
3. Moffatt B., Dunn J., Studier W. Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase // Ibid.— 1984.— 173, N 2.— P. 265—269.
4. Bacteriophage lambda — *E. coli* K12 vector host system for gene cloning and expression under lactose promoter control / P. Charney, A. Louise, A. Fritsch et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1979.— 170, N 2.— P. 171—178.
5. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase / P. Davanloo, A. Rosenberg, J. Dunn, W. Studier // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81, N 7.— P. 2035—2039.
6. Eukaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase / T. Fuerst, E. Niles, W. Studier, B. Moss // Ibid.— 1986.— 83, N 21.— P. 8122—8126.
7. Миллер Д. Определение ферментов лактозного оперона.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
8. Черных С. И., Глушакова Л. Г., Стельмашенко Л. Н. Исследование фагозависимого синтеза β -галактозидазы клетками *Escherichia coli* // Микробиол. журн.— 1979.— 41, № 5.— С. 479—482.

9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
10. Moire A., Brammer W. J. The use of specialized transducing phages in the amplification of enzyme production // Mol. and Gen. Genet.— 1976.— 149, N 1.— P. 87—99.
11. Суперсинтез β -галактозидазы, индуцированный некоторыми амбер-мутантами фага λ ptac5c1857 / Л. Г. Глушакова, С. И. Черных, Л. Н. Стельмашенко, В. А. Кордюм // Молекуляр. биология.— 1982.— Вып. 30.— С. 37—41.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 06.02.89

УДК 575.113.1:581.143.6

В. Т. Соловьян, О. В. Захленюк, В. А. Кунах

ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНОМА РАУВОЛЬФИИ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO

Проведено сравнительное изучение геномов интактного растения и культивируемых клеток раувольфии. Методом дот-гибридизации показано отсутствие значительных геномных перестроек в непродолжительно культивируемых каллусах *R. serpentina* и *R. verticillata*, в то время как геном длительно пассируемых клеток *R. serpentina* претерпевает значительные изменения.

Рестрикционным анализом выявлено наличие геномных перестроек как в первичных каллусах *R. serpentina* и *R. verticillata*, так и в длительно пассируемых клетках *R. serpentina*.

Заключено, что геномные перестройки могут происходить на ранних этапах культивирования, однако процесс пассирования in vitro приводит к более значительным изменениям генома.

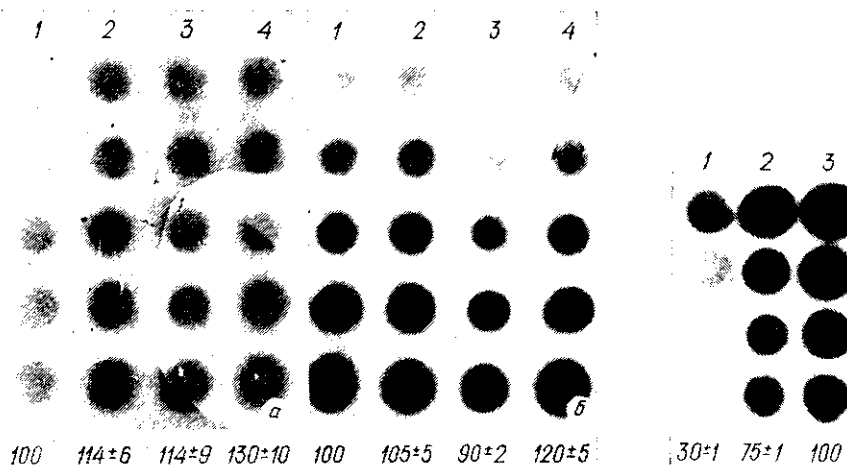


Рис. 1. Дот-гибридизация ^{32}P -меченных частых (а) и умеренных (б) повторов линии *R. v.-1.5* с суммарной ДНК растения и каллусов *R. verticillata*: ДНК интактного растения (1); ДНК первичного каллуса (2); ДНК линии *R. v.-1.0*, культивируемой in vitro 1 год (3); ДНК линии *R. v.-1.5*. Цифры внизу — средний процент гомологии, вычисленный по результатам четырех опытов

Fig. 1. Dot hybridization of ^{32}P -labeled highly (a) and middle (b) repeated sequences from line *R. v.-1.5* with total DNAs from plant and calli of *R. verticillata*: DNA from intact plant (1); DNA from primary callus (2); DNA from line *R. v.-1.0* cultivated for 1 year (3); DNA from line *R. v.-1.5* cultivated for 1.5 year (4). Figures below are the sequence homology percentages average of the four determinations

Рис. 2. Дот-гибридизация ^{32}P -меченных повторяющихся последовательностей (Cot до 100) первичного каллуса с суммарной ДНК растения и каллусов *R. serpentina*: ДНК длительно пассируемой линии *R. serpentina* (1); ДНК первичного каллуса (2); ДНК интактного растения (3). Цифры внизу — средний процент гомологии повторов, вычисленный по результатам четырех опытов

Fig. 2. Dot hybridization of ^{32}P -labeled primary callus repeated sequences (Cot up to 100) with total DNAs from plant and calli of *R. serpentina*: DNA from long cultivated *R. serpentina* line (1); DNA from primary callus (2); DNA from intact plant (3). Figures below are the sequence homology percentages average of the four determinations