



УДК 579.252.55

М. Ф. Алексеев

КЛОНИРОВАНИЕ В ГЕНЕ *lac Iq* ПЛАЗМИД СЕРИИ *pTTQ*: «ОБРАТНАЯ» ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ

Предложен метод клонирования *MluI*-, *BclI*-, *ApaI*-, *BssHI*- и *EcoRV*-фрагментов ДНК в гене *lacIq* плазмид серии *pTTQ*. Рекомбинантные клоны отбираются как окрашенные в синий цвет колонии на чашках, содержащих ампициллин и *X-gal*.

Введение. Плазмиды *pUC18* и *pUC19* представляют собой чрезвычайно удобные для клонирования векторы. Основное их преимущество — наличие полилинкера, включающего 13 уникальных сайтов рестрикции внутри α -фрагмента гена β -галактозидазы, что значительно облегчает селекцию рекомбинантных клонов, которые могут быть отобраны на чашках с IPTG и *X-gal* как бесцветные колонии на фоне окрашенных нерекомбинантных [1] при клонировании в штаммах *Escherichia coli* с генотипом $\Delta(lac-pro)$, F'*lacIqZAM15*. Однако сайты внутри полилинкеров плазмид *pUC18* и *pUC19* далеко не перекрывают весь спектр известных в настоящее время рестриктаз. В частности, в этих полилинкерах отсутствуют сайты узнавания для рестриктаз *MluI*, *BclI*, *ApaI*, *BssHI*, *EcoRV*.

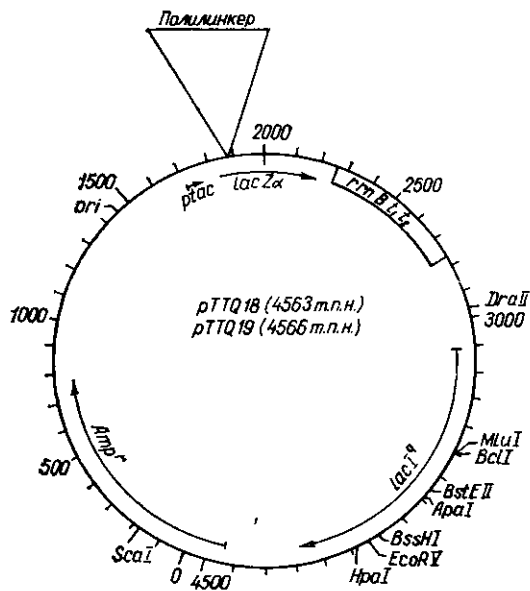
Предлагается простой метод клонирования *MluI*-, *BclI*-, *ApaI*-, *BssHI*- и *EcoRV*-фрагментов ДНК в гене *lacIq* плазмид серии *pTTQ* с использованием «обратной» цветной реакции.

Материалы и методы. В работе использовали: штамм *E. coli* JM109, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *thi*, *supE44*, *relA1*, λ -, $\Delta(lac-proA, B)$, F', *traD36*, *proA, B*, *lacIqZAM15* [2], ДНК фага лямбда, рестриктаза *EcoRV*, ДНК-лигаза фага T4, *X-gal* производства НПО «Биопол» (Москва). Выделение плазмидной ДНК, рестрикцию и лигирование осуществляли, как описано в [3].

Результаты и обсуждение. Недавно Старк сообщил о создании плазмид *pTTQ18* и *pTTQ19* [4] (рис. 1), предназначенных для экспрессии клонированных генов в *E. coli* под контролем *tac*-промотора [5] и имеющих в своем составе α -фрагмент гена *lacZ* с полилинкером плазмид *pUC18* и *pUC19* соответственно, однако находится этот фрагмент под контролем промотора *tac*, а не *lac*, в отличие от плазмид *pUC18* и *pUC19*. Известно, что мультикопийные плазмиды, включающие *lac*-промотор (например, плазмиды серии *pUC*), требуют для своего размножения специальные штаммы *E. coli*, имеющие в хромосоме *lacIq* аллель гена *lacI*, так как множественные копии оператора титруют репрессор в штаммах дикого типа (*lacI*⁺-штаммах). Это приводит к неполному подавлению транскрипции с *lac*-промотора в отсутствие индукции [6, 7]. Штаммы *lacIq E. coli* синтезируют почти в 10 раз больше *lac*-репрессора [8], что обеспечивает полное подавление транскрипции с *lac*-промотора мультикопийных плазмид при отсутствии индукции. Старк [4] сообщает также, что транскрипция с *tac*-промотора (который в 5—10 раз сильнее промотора *lacUV5* [9]) мультикопийных плазмид не подавляется полностью даже в *lacIq*-штаммах *E. coli*, поэтому он ввел в состав сконструированных им экспрессирующих векторов ген *lacIq*, в результате чего транскрипция с *tac*-про-

© М. Ф. Алексеев, 1992

мотора в отсутствие индукции была подавлена полностью. В данной работе предлагается использовать явление неполного подавления транскрипции с *tac*-промотора мультикопийных плазмид в *lacIq*-штаммах *E. coli* при отсутствии индукции для селекции рекомбинантных плазмид, содержащих вставки фрагментов ДНК в гене *lacIq* плазмид *pTTQ18* и *pTTQ19*. Действительно, клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды, должны экспрессировать α -фрагмент гена β -галактозидазы и, следовательно, давать синюю окраску на чашках с X-gal в



результате α -комплементации в штаммах *E. coli* с генотипом $\Delta(lac-prg)$, F'*lacIq*ZAM15 [10]. Нерекombинантные клоны, имеющие интактный ген *lacIq* в составе плазмиды, такой окраски давать не должны вследствие полного подавления транскрипции с *tac*-промотора.

Предлагаемая методика была апробирована при клонировании *EcoRV*-фрагментов ДНК фага лямбда в плазмиде *pTTQ19*. Плазмиду *pTTQ19*

Рис. 1. Физическая и генетическая карты плазмид *pTTQ18/19*; *rrnB t1, t2* — терминаторы рибосомного оперона *E. coli*; *ori* — область начала репликации. Стрелками указаны направления транскрипции генов

и ДНК фага лямбда гидролизовали рестриктазой *EcoRV* и лигировали между собой. Лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* JM1C9 и высевали трансформанты на чашки с агаризованной

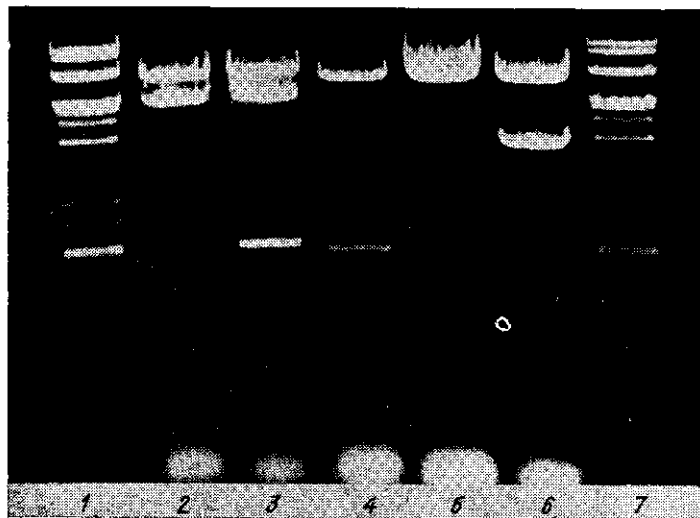


Рис. 2. Рестрикционный анализ плазмидной ДНК из рекомбинантных (синих) клонов: 1, 7 — ДНК фага лямбда, гидролизованная *EcoRV*; 2—6 — ДНК рекомбинантных плазмид, гидролизованная *EcoRV*

средой LB, содержащей ампициллин и X-gal. Из голубых колоний выделяли плазмидную ДНК и гидролизовали ее рестриктазой *EcoRV*. Результаты представлены на рис. 2. Видно, что рекомбинанты содер-

жат вставки одного — двух фрагментов ДНК различного размера. Ранее данная методика была использована нами для субклонирования *MluI*-фрагмента плазмиды *pLG13* [11], несущего ген рестриктазы *EcoRV* (результаты не приведены). Очевидно, сайты *BclI*, *ApaI* и *BssHI*, расположенные между *MluI*- и *EcoRV*-сайтами в структурной части гена *lacIq*, также могут быть применены для селекции рекомбинантных клонов с помощью «обратной» цветной реакции.

Таким образом, уникальные сайты рестрикции для пяти рестриктаз, узнающих невырожденные шестинуклеотидные последовательности и локализованные внутри гена *lacIq* плазмид *pTTQ18* и *pTTQ19* (*MluI*, *BclI*, *ApaI*, *BssHI*, *EcoRV*), могут быть использованы для клонирования фрагментов ДНК с помощью «обратной» цветной реакции. В отличие от «прямой» цветной реакции, когда рекомбинанты отбираются как бесцветные колонии на фоне окрашенных нерекомбинантных, в этом случае отпадает необходимость в применении дорогостоящего синтетического индуктора IPTG. Кроме того, плазмиды *pTTQ18* и *pTTQ19* имеют уникальные сайты рестрикции в составе полилинкера, пригодные при клонировании с использованием «прямой» цветной реакции для селекции рекомбинантных клонов.

Summary. The method for cloning *MluI*-, *BclI*-, *ApaI*-, *BssHI*- and *EcoRV*-DNA fragments in the *lacIq* gene of *pTTQ* plasmids is described. Recombinant clones are selected as coloured in blue colour colonies on plates containing ampicillin and X-gal.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved *M13* phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the *M13mp18* and *pUC19* vectors // *Gene*.— 1985.— 33, N 1.— P. 103—119.
2. Кайзер К., Мюррей Н., Дэвис Р. В. Клонирование ДНК. Методы.— М.: Мир, 1988.— 538 с.
3. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: М.: Мир, 1984.— 480 с.
4. Stark M. J. R. Multicopy expression vectors carrying the *lac* repressor gene for the regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli* // *Gene*.— 1987.— 51, N 2—3.— P. 255—267.
5. Amann E., Brosius J., Ptashne M. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli* // *Ibid.*— 1983.— 25, N 2.— P. 167—178.
6. Backmann K., Ptashne M., Gilbert W. Construction of plasmids carrying the *cI* gene of bacteriophage // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1974.— 73, N 11.— P. 4174—4178.
7. Heyneker H. L., Shine J., Goodman H. M. et al. Synthetic *lac* operator DNA is functional *in vivo* // *Nature*.— 1976.— 263, N 5582.— P. 748—752.
8. Muller-Hill B. *lac* repressor and *lac* operator // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*— 1975.— 30.— P. 227—252.
9. De Boer H. A., Comstock L. J., Vasser J. The *lac* promoter: a functional hybrid derived from *trp* and *lac* promoters // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1983.— 80, N 1.— P. 21—35.
10. Vieira J., Messing J. The *pUC* plasmids, an *M13mp7*-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // *Gene*.— 1982.— 19, N 3.— P. 259—268.
11. Кравец А. Н., Захарова М. В., Солонин А. С. и др. Клонирование и регуляция экспрессии генов системы рестрикции и модификации *EcoRV*. // *Молекуляр. биология*.— 1990.— 24, № 2.— С. 438—447.

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

Получено 05.05.92