



УДК 577.21

ОДНОНАПРАВЛЕННАЯ ОРИЕНТАЦИЯ ПРИ КЛОНИРОВАНИИ ФРАГМЕНТОВ *rplKAIL-rpoBC*-ОПЕРОНА *Escherichia coli* В МНОГОКОПИЙНОЙ ПЛАЗМИДЕ *pUC*

Е. Б. Патон, И. В. Крупская, А. Н. Живолуп

Введение. Опероны рибосомных белков *E. coli* включают функционально взаимосвязанные гены, активность которых регулируется по типу обратной связи белками-репрессорами [1—3]. Кластер генов *rplKAIL-rpoBC* объединяет три оперона. В их транскрипции участвуют два основных промотора P_{L11} и P_{L10} . Регуляторным белком *rplKA*-оперона, гены которого направляют синтез рибосомных белков *L11* и *L1*, является второй из них. Оперон *rplJL*, программирующий синтез белков *L10* и *L7/L12*, регулируется *L10*. Известно [1, 3], что регуляция активности генов рибосомных белков осуществляется, в частности, на уровне трансляции. При этом белок-регулятор связывается со специфическим сайтом мРНК, репрессуя таким образом, трансляцию генов контролируемого им оперона. По данным литературы [4, 5], поддержание в клетках *E. coli* многокопийных рекомбинантных плазмид, включающих гены регуляторных рибосомных белков, невозможно. В частности [5, 6], наличие в мультикопийной плазмиде гена *rplJ*, кодирующего синтез белка *L10*, приводит к ингибированию синтеза второго белка — *L7/L12*, — кодируемого геном *rplL* хромосомы, результатом чего является летальное для клеток-хозяев нарушение сборки рибосом. Ранее нами показано [7—9], что клонирование в многокопийной плазмиде *pUC*, содержащей в области встраивания чужеродной ДНК промотор *iac*, фрагментов *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli* оказывается возможным, сопровождаясь ориентационными эффектами. Установлено [8, 9], что единственно возможная ориентация клонируемых фрагментов, при которой направление транскрипции встраиваемых генов и гена *lacZ* векторной плазмиды противоположно, обусловлена уровнем экспрессии гена *rplJ*. В данной работе исследованы закономерности, сопровождающие клонирование в *pUC* фрагментов *rplKAIL*-оперона *E. coli*, с учетом функциональной роли кодируемых данным опероном белков.

Материалы и методы. При введении плазмид *pUC* в качестве реципиентного использован штамм *E. coli* *K12 JM101* [10]. Для получения компетентных клеток, их трансформации, выделения и анализа плазмидной ДНК применяли стандартные методы, описанные в [11]. ДНК обрабатывали рестриктазами *HincII* («Sigma», США), *HinII*, *HinIII* и *PaeI*, предоставленными В. Лаучисом, а также другими — производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Использовали ДНК-лигазу фага *T4* (НПО «Фермент», Вильнюс) и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* производства НПО «Вектор» (Новосибирск). Дефосфорилирование тупых и выступающих концов фрагментов ДНК, образованных в результате рестрикции, проводили с помощью щелочной фосфатазы из тонкого кишечника теленка («Pharmacia R.-L.», США). Плазмидную ДНК в микро- и препаративных количествах получали по методу [12], включая в последнем случае стадию очистки центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. Клетки *E. coli* культивировали в богатой среде LB [13]. Среда для селекции рекомбинант-

ных клонов включала ампициллин (отечественного производства) в концентрации 50 мкг/мл, ZGal (5-бром-4-хлор-β-D-галактопиранозид, синтезированный и предоставленный А. Г. Терентьевым, Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР) и в случае необходимости — индуктор промотора *lac* — ИПТГ (изопропил-β-D-галактопиранозид) фирмы «Sigma» (США) в стандартных концентрациях [10]. Электрофорез и

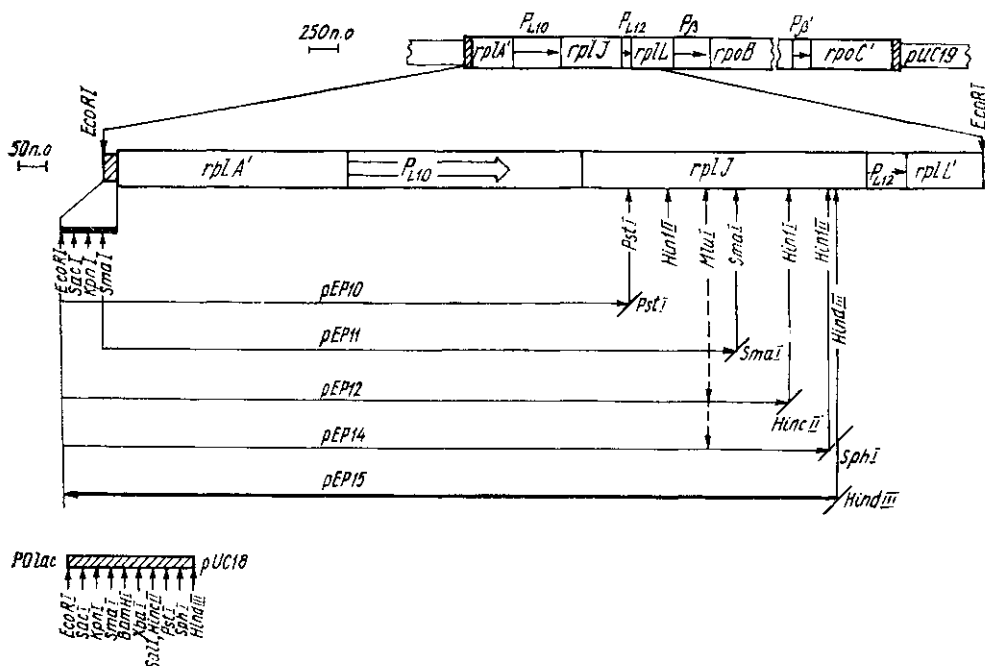


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантных плазмид *pUC*, содержащих проксимальные участки гена *rplJ* с промотором P_{L10} (ориентация встроенных фрагментов — направление транскрипции гена *rplJ*, инициируемой с промотора P_{L10} , — показана горизонтальными стрелками) (а) и электрофорез в 7%-ном ПААГ расщепленных *SmaI* и *HindIII* плазмид *pEP14* (1—4, 6—8) и *pEP12* (5) (стрелкой указан увеличенный *SmaI*-*HindIII*-фрагмент *pEP14*; в качестве репера использована ДНК *pBR322*, расщепленная *BspRI*)

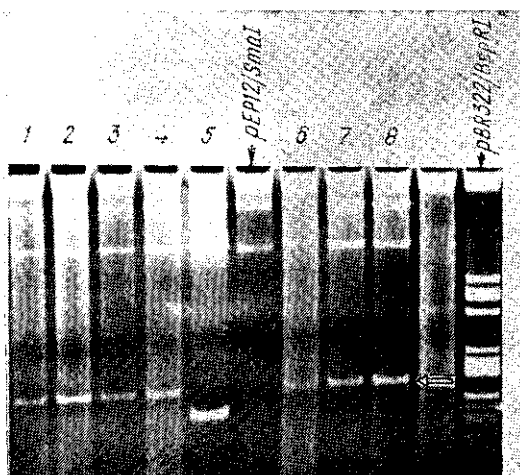


Fig. 1. Scheme of construction of recombinant *pUC* plasmids, containing proximal portions of *rplJ* gene with the P_{L10} promoter (horizontal arrows designate orientation of the inserted fragments — direction of transcription of the *rplJ* gene initiated by P_{L10}) (a) and a 7% PAAG electrophoresis of double *SmaI*-*HindIII* digested *pEP14* (lanes 1, 2, 4, 6, 7, 8) and *pEP12*(5) plasmids (the enlarged *SmaI*-*HindIII* fragment of *pEP14* is indicated by an arrow)

элюцию ДНК проводили по стандартным методикам, используя горизонтальные агарозные и вертикальные полиакриламидные гели (ПААГ). Фрагменты ДНК выделяли из легкоплавкой агарозы («BioRad», США), как указано в [11]. Реакцию лигирования в случае тупых концов проводили при 4°C в течение 12 ч, в случае липких концов — при 20°C в течение 1—2 ч. Активность β-галактозидазы измеряли по методу Миллера [13].

Конструирование рекомбинантных плазмид, включающих фрагменты гена *rplJ*. Для получения и последующего встраивания фрагментов *rplJ*-оперона *E. coli*, содержащих участки гена *rplJ* и промотор P_{L10} , использовали *EcoRI*-фрагмент (6,9 т. п. о.) плазмиды *pUC19/rpoB*, описанной нами ранее [7]

(рис. 1). Фрагмент *EcoRI-PstI*, содержащий промотор P_{L10} , лидерную последовательность и начало структурной части гена *rplJ*, встраивали в плазмиду *pUC18* [14], расщепленную этими же ферментами. Для встраивания *SmaI*-фрагмента, содержащего большой участок гена *rplJ*, использовали ДНК *pUC18*, гидролизованную *SmaI*. Учи-

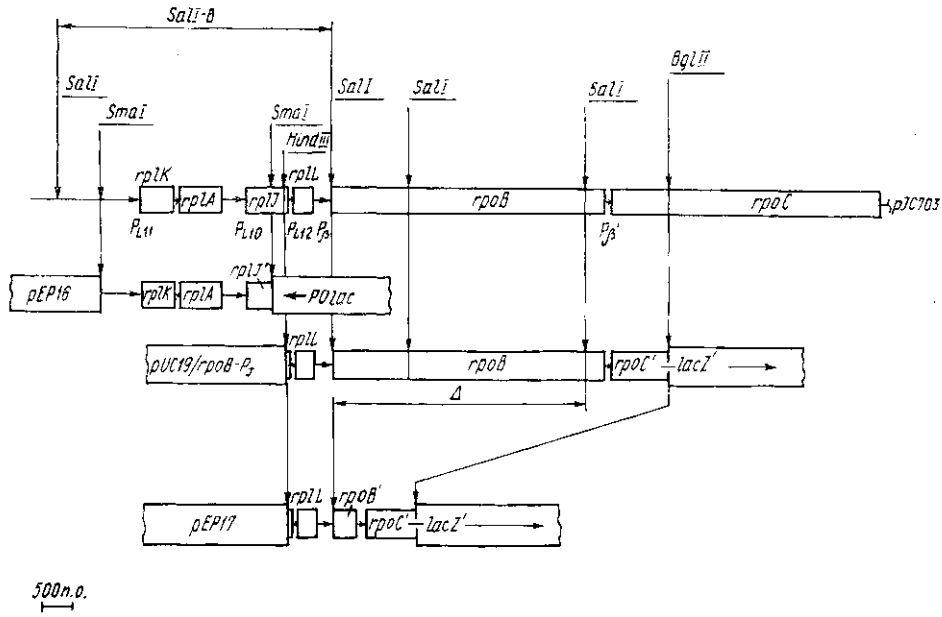


Рис. 2. Конструирование рекомбинантных плазмид *pEP16*, содержащей *SmaI*-*B*-фрагмент (гены *rplKA*), *pJC703* и *pEP17*, содержащей ген *rplL* (а) и электрофорез в 0,8 %-ной агарозе расщепленных *EcoRI* рекомбинантных плазмид *pEP16*, содержащих *SmaI*-*B*-фрагмент *pJC703*

Fig. 2. Construction of recombinant plasmids *pEP16* containing the *pJC703* *SmaI*-*B*-fragment (genes *rplKA*) and *pEP17* containing the *rplL* gene (a) and an 0.8 % agarose gel electrophoresis of *EcoRI* cleaved *pEP16* recombinant plasmids with an inserted *pJC703* *SmaI*-*B*-fragment

тывая нарушение рамки считывания гена *lacZ* в результате встраивания обоих фрагментов, среда для селекции рекомбинантных клонов включала ZGal и ИПТГ. В наличии встроенных фрагментов убеждались, расщепляя плазмидную ДНК, выделенную из клонов, утративших *Lac*⁺-фенотип, рестриктазами *EcoRI* и *PstI* совместно (рекомбинантная плаزمида *pEP10*) и *SmaI* (плазмиды *pEP11*).

Встраивание более протяженного участка гена *rplJ* (фрагмент *EcoRI-HinII*) проводили, расщепив ДНК *pUC18* совместным действием *EcoRI* и *HincII*. Выступающие 5'-*HincII*-концы *EcoRI-HincII*-фрагмента предварительно восполняли с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* по стандартной методике [11]. Рекомбинантные плазмиды (*pEP12*) были выделены из клонов, утративших *Lac*⁺-фенотип. Учи-

тытая нарушение сайтов узнавания *HincII* и *HinII* в месте лигирования образуемых ими 5'-концов, в наличии встроенного *EcoRI-HinII*-фрагмента убеждались, расщепляя рекомбинантные плазмиды *EcoRI* и *PaeI* (изошизомер *SphI*) совместно. Наличие встроенного фрагмента подтвердилось и при расщеплении рекомбинантных плазмид другими ферментами рестрикции, имеющими сайты узнавания в клонированном участке гена *rplJ*.

Для последующего увеличения клонируемой проксимальной части гена *rplJ* была использована эндонуклеаза рестрикции *HinIII*. При наличии двух сайтов узнавания данной рестриктазы, расположенных в структурной части гена *rplJ* по обе стороны от сайта узнавания *MluI*, в качестве вектора для встраивания использовали плазмиду *pEP12*. ДНК *pEP12* расщепляли совместным действием *MluI* и *PaeI*. Источником встраиваемого участка гена *rplJ* послужил *PstI*-фрагмент (содержащий 421 п. о. гена *rplJ* и 131 п. о. гена *rplL*), выделенный из плазмиды *pUC19*, включающей *BspRI*-фрагмент *rplJL*-оперона [9]. В результате расщепления *PstI*-фрагмента совместным действием *MluI* и *HinIII* был выделен *MluI-HinIII*-фрагмент гена *rplJ* величиной 205 п. о. Для увеличения эффективности встраивания ДНК *pEP12*, расщепленную *MluI* и *PaeI* (учитывая комплементарность *HinIII*- и *PaeI*-концов), обрабатывали щелочной фосфатазой из тонкого кишечника теленка и отделяли от образующегося меньшего *MluI-PaeI*-фрагмента электрофорезом и последующей элюцией. После трансформации клеток *E. coli* аликвотами лигазной смеси для дальнейшего анализа отбирали плазмиды, обладавшие большей по сравнению с *pEP12* молекулярной массой. О наличии встроенного фрагмента свидетельствовала картина расщепления рекомбинантных плазмид совместным действием *SmaI* и *HindIII* (рис. 2). Встроенный фрагмент чужеродной ДНК полученной рекомбинантной плазмиды *pEP14* имеет два сайта узнавания *SmaI*: расположенный внутри гена *rplJ* и перед ним, принадлежащий полилинкерной области *pUC19*. Расщепление ДНК *pEP12* и *pEP14* *SmaI* и *HindIII* совместно показало наличие в них одинакового *SmaI*-фрагмента (1120 п. о.) и *SmaI-HindIII*-фрагмента, увеличенного у *pEP14* за счет встраивания *MluI-HinIII*-фрагмента на 59. п. о. (см. рис. 1, б).

В качестве векторных для клонирования *EcoRI-HindIII*-фрагмента *rplJL*-оперона были использованы плазмиды *pUC18* и *pUC19*, ДНК которых расщепляли совместным действием указанных эндонуклеаз. Анализу подвергали трансформантов, не проявлявших *Lac*⁺-фенотипа на среде с ZGal и ИПТГ. В отличие от *pUC19* количество таких клонов в случае *pUC18* не превышало 0,1%. Дальнейший анализ свидетельствовал о возможности получения лишь рекомбинантных плазмид *pUC19* (*pEP15*, рис. 1), обеспечивавших альтернативную ориентацию встраиваемого фрагмента ДНК.

Клонирование гена *rplL*. При клонировании гена *rplL* использовали описанную ранее [7] плазмиду *pUC19*, содержащую *HindIII-BglII*-фрагмент *rplJL*-оперона (гены *rplII*, *rpoBC'*). Для удаления гена *rpoB* и сохранения гена *rpoC'-lacZ'* был проведен гидролиз исходной плазмиды эндонуклеазой рестрикции *SalGI* (рис. 2, а). После разделения образующихся фрагментов и лигирования большего из них в результате трансформации клеток *E. coli* отобраны клоны, сохранявшие, благодаря наличию гена *rpoC'-lacZ'*, *Lac*⁺-фенотип. Плазмидную ДНК из таких клонов анализировали, расщепляя совместно *SalGI* и *HindIII* (рис. 2, а). Об уровне экспрессии гена *rplI* в рекомбинантной плазмиде *pEP17* судили по активности β-галактозидазы, обеспечиваемой присутствием в клетках *E. coli* плазмиды *pEP17*. Индукция промотора *lac* ИПТГ приводила к 10-кратному повышению активности β-галактозидазы (10 и 100 ед. Миллера соответственно), что служило косвенным свидетельством возрастания при индукции ИПТГ экспрессии гена *rplL*.

Клонирование фрагментов, включающих опероны *rplKA* и *rplKAJL*. Источником *SmaI-B*-фрагмента, включающего полный оперон *rplKA*, и *SalGI-B*-фрагмента, содержащего оперон *rplKAJL*, послужила космида *pJC703* [15]. *SmaI-B*-фрагмент встраивали в плазмиду *pUC19*, предварительно расщепленную той же эндонуклеазой. Учитывая нарушение рамки считывания гена *lacZ'* *pUC*, при встраивании *SmaI*-фрагмента в обеих ориентациях для селекции рекомбинантов использовали среду с ZGal и ИПТГ. При анализе рекомбинантных плазмид расщеплением их *EcoRI* (имеющей асимметрично расположенный сайт узнавания во фрагменте и уникальный сайт в области полилинкера *pUC*), а также *BglII* и *HindIII* совместно (*BglII* имеет асимметричный сайт во фрагменте *SmaI-B*, *HindIII* — в полилинкере *pUC*) было установлено, что картина расщепления плазмид из 40 клонов одинакова (см. рис. 2, б) и свидетельствует об однонаправленной ориентации в них (*pEP16*) клонированного

фрагмента, при которой направление транскрипции встроенных генов и гена *lacZ'* *pUC19* противоположно.

Для клонирования *SalGI*-*B*-фрагмента *pJC703*, содержащего гены *rplKAIL*, в качестве векторных использовали плазмиды *pUC18*, *pUC19*, а также *pUC18 Δ P_{lac}*, ДНК которых предварительно гидролизовали *SalGI* и обрабатывали щелочной фосфатазой.

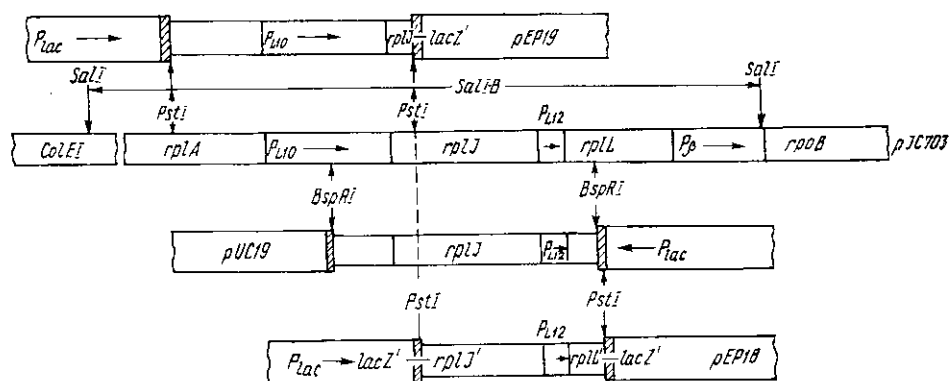


Рис. 3. Конструирование рекомбинантных плазмид *pEP18*, содержащей дистальную часть гена *rplI* (ген *lacZ'-rplI'*), и *pEP19*, использованной для сравнения эффективности промоторов P_{lac} и P_{L10} .

Fig. 3. Construction of recombinant plasmids *pEP18* containing the *rplI*-gene distal portion (gene *lacZ'-rplI'*) and *pEP19*, used to compare the efficiency of P_{lac} and P_{L10} promoters

SalGI-фрагмент не содержит начала структурной части дистального (см. рис. 2, а) гена *rpoB*, но включает часть последовательности, регулирующей экспрессию данного гена, в частности P_{β} . Исходя из этого, мы не исключали возможности трансляции химерного гена *lacZ'*, который мог быть образован при прямой ориентации встраиваемого фрагмента. Использование в качестве векторной плазмиды *pUC18* с deletированной областью PO_{lac} способствовало селекции рекомбинантных плазмид по Lac^{+} -фенотипу и исключало возможное влияние P_{lac} на ориентацию клонируемого фрагмента. Векторная плаزمида *pUC18 Δ P_{lac}* была получена в результате частичного гидролиза ДНК *pUC18 PvuII*, последующего полного гидролиза *SmaI* и лигирования. Аликвоты лигазной смеси использовали для трансформации и отбирали клоны с Lac^{-} -фенотипом. Рестриктивным анализом отобранных плазмид контролировали сохранность в полилинкерной области и ниже сайтов расщепления *BamHI* и исчезновение их в начале полилинкерной области (полилинкерная область плазмиды *pUC* изображена на рис. 1, а). После лигирования *SalGI*-фрагмента с ДНК *pUC18* не было обнаружено колоний, восстанавливающих Lac^{+} -фенотип в результате образования химерного гена *lacZ*, т. е. невозможность клонирования *SalGI*-*B*-фрагмента в прямой ориентации.

Сравнение эффективности промоторов P_{lac} и P_{L10} . Для сравнения их эффективности была сконструирована рекомбинантная плазмиды *pUC9*, включавшая *PstI*-субфрагмент фрагмента *SalGI*-*B* *pJC703*. Гидролиз *SalGI*-*B*-фрагмента *PstI* приводит к образованию субфрагментов, включающих проксимальные части генов *rplK* с промотором P_{L11} и *rplI* с промотором P_{L10} [16]. Однако лишь во втором случае встраивание *PstI*-субфрагмента в *pUC9* приводит к восстановлению рамки считывания гена *lacZ* [17]. В качестве векторной использовали плазмиду *pUC9* с нарушенной структурой гена *lacZ* за счет гидролиза *HindIII* и восполнения образующихся 5'-концов фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I. Активность β -галактозидазы, обеспечиваемая рекомбинантной плазмидой *pEP19*, содержащей промоторы P_{lac} и P_{L10} (рис. 3), соответствовала 9 ед. Миллера без индукции ИПТГ (когда транскрипция гена *rplI'-lacZ'* обеспечивается промотором P_{L10}) и 35 ед. Миллера (при индукции промотора P_{lac} добавлением ИПТГ).

Результаты и обсуждение. В настоящее время установлено, что синтез большинства рибосомных белков регулируется на уровне трансляции белками-регуляторами, имеющими специфические сайты связывания с рРНК и мРНК. Во время сборки рибосом регуляторные бел-

ки связываются с рРНК, в условиях же, когда количество синтезируемых рибосомных белков превосходит таковое, необходимое для сборки рибосом, белки-регуляторы связываются с определенными сайтами мРНК, препятствуя таким образом трансляции генов регулируемых ими оперонов [1—3]. В результате жесткой регуляции синтеза рибосомных белков клонирование программирующих их синтез генов на многокопийных плазмидах оказалось невозможным [4, 5]. Белок-репрессор, синтезируясь в больших количествах под контролем многокопийного гена плазмиды, блокирует синтез других белков того же оперона, кодируемых однокопийными генами хромосомы. Это приводит к нарушению сборки рибосом и летальному для клеток-хозяев эффекту. На практике мы столкнулись [7—9] с возможностью клонирования фрагментов ДНК *E. coli*, включающих ген регуляторного белка *rplJL*-оперона, в многокопийной плазмиде *pUC*. Мы предположили, что такая возможность обеспечивается наличием в векторной плазмиде более сильного, чем собственный промотор гена *rplJ*— P_{L10} , — промотора *lac*, который при единственно возможной ориентации клонируемых фрагментов инициирует транскрипцию в конвергентном по отношению к P_{L10} направлении. Значительное снижение транскрипции и в результате этого экспрессии гена *rplJ* делают возможным существование рекомбинантной плазмиды *pUC*, содержащей этот ген. Тем не менее такая плаزمида значительно замедляет рост клеток-хозяев и в конечном счете элиминирует. Явление однонаправленной ориентации при клонировании в плазмиде *pUC* было положено в основу изучения регуляции генов *rplKAIL-rpoBC*-оперона и, в частности, определения минимального размера проксимальной части гена *rplJ*, обеспечивающей синтез регуляторно активного белка *L10*. Из литературы известно [5, 6], что плазмиды, включающие ген *rplJ*, кодирующий белок *L10* без 20 аминокислот С-конца, замедляют рост клеток-хозяев. Эффект таких плазмид ставится летальным благодаря встраиванию фрагмента, содержащего гены *rplKA* под контролем промотора P_{L11} [6]. Для подтверждения предположения о причине наблюдаемой нами однонаправленной ориентации гена *rplJ* при клонировании в плазмиде *pUC* была исследована возможность встраивания вышеуказанного проксимального участка этого гена в плазмиды *pUC18* и *pUC19*. В данном случае в каждой из плазмид возможна лишь одна ориентация *EcoRI-HindIII*-фрагмента, включающего ген *rplJ* с собственным промотором P_{L10} . Как и следовало ожидать, данный фрагмент оказался «клонированным» лишь в плазмиде *pUC19*. При альтернативной ориентации гена *rplJ*, т. е. при встраивании его в плазмиду *pUC18*, экспрессия его стала бы выше в результате дополнительной транскрипции с более сильного промотора P_{lac} , который, по нашим данным, превосходит P_{L10} в 3—4 раза. Учитывая летальность для клеток-хозяев больших количеств регуляторно способного белка *L10*, в плазмиду *pUC18*, обеспечивающую дополнительную транскрипцию клонируемых фрагментов с промотора P_{lac} , встраивали последовательно увеличиваемые участки гена *rplJ*. Как можно увидеть на рис. 1 (см. также «Материалы и методы»), для всех, кроме вышеуказанного *EcoRI-HindIII*-фрагмента, получение рекомбинантных плазмид с прямой ориентацией гена *rplJ* оказалось возможным. *pEP14* содержит проксимальную часть гена *rplJ* (до сайта узнавания *HinIII*), которая отличается от регуляторно активной части гена *rplJ* плазмиды *pEP15* точечной мутацией $A_{2150} \rightarrow C$, вызывающей замену $Lys_{144} \rightarrow Gln$, и делецией трех пар оснований GAA, кодирующих Glu_{145} (позиции 2150—2155 по первичной последовательности, установленной Постом с соавт. [16]). Такое изменение последовательности вызывает исчезновение в белке *L10* двух заряженных аминокислотных остатков, способных обусловить пространственную структуру белка или непосредственно участвовать в белково-нуклеиновых взаимодействиях.

Была исследована также возможность сохранения регуляторной функции дистальным фрагментом гена *rplJ*, экспрессия которого обеспечивалась в результате слияния с геном *lacZ'* плазмиды *pUC9*. *PstI*-

фрагмент, содержащий дистальный участок гена *rplJ* (421 п. о.) и проксимальный участок гена *rplJ* (131 п. о.) был встроены в плазмиду *pUC9*, где транскрипция гена *lacZ'-rplJ'* обеспечивалась присутствием промотора *lac* (рис. 3). Возможность существования плазмиды *pEP18*, в которой индукцией промотора *lac* ИПТГ создавалась высокая эффективность транскрипции гена *lacZ'-rplJ'*, свидетельствовала об отсутствии регуляторной функции у гибридного белка. Последний по сравнению с нативным белком не имеет N-концевого участка, включающего пять заряженных аминокислотных остатков [16]. Гибридный белок *L10*, кодируемый геном *lacZ'-rplJ'* плазмиды *pEP18*, содержит критическую для регуляторной функции область (отсутствующую в гене *rplJ'* плазмиды *pEP14*) и, следовательно, можно предположить, что для обеспечения регуляторной активности рибосомного белка *L10* необходима совокупность его N-концевого (плаزمиды *pEP18*) и C-концевого (плазмиды *pEP14*) участков.

Из литературы известно [18, 19], что в регуляции активности генов *rplJL*-оперона *E. coli* может принимать участие комплекс белков *L10* и *L7/L12*. В отличие от оперона *rplKA*, где трансляция генов *rplK* и *rplA* сопряжена (coupled) [20], гены оперона *rplJL* разделены протяженным участком, содержащим дополнительный промотор P_{L12} и, по-видимому, сигналы регуляции трансляции, обеспечивающие синтез белков *L10* и *L7/L12* в молярном отношении 1 : 4. Для проверки возможной регуляторной функции белка *L7/L12*, при которой сверхпродукция этого белка, подобно *L10*, имела бы негативный для клеток-хозяев эффект, было проведено конструирование рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей возможность индуцибельного синтеза белка *L7/L12*. Плаزمиды *pEP17*, полученная из ранее описанной [7] плазмиды (рис. 2, а), обеспечивает участие в транскрипции гена *rplL* промоторов P_{L12} (минорного для *rplJL*-оперона) и P_{lac} . Индукция промотора *lac* приводит к 10-кратному повышению активности β -галактозидазы, обеспечиваемой присутствием в клетках *E. coli* плазмиды *pEP17*, что, однако, не сказывается отрицательно на их скорости роста и жизнеспособности. По-видимому, белок *L7/L12* не имеет самостоятельной регуляторной функции.

Отдельный интерес представляло клонирование в *pUC* фрагментов, включающих полные опероны *rplJL*, *rplKA* и *rplKAJL*. Учитывая дискоординирующий и в результате летальный для клеток-хозяев эффект клонирования генов отдельных рибосомных белков, можно было предположить, что встраивание в многокопийную плазмиду полного оперона сохранит взаимную регуляцию генов внутри него и, следовательно, не будет сопровождаться однонаправленной ориентацией клонируемого оперона, если его гены не имеют жесткой взаимной регуляции с другими клеточными генами (оперонами). Ранее мы показали [7] наличие единственно возможной ориентации при клонировании в *pUC* *BglIII*-фрагмента, содержащего полный оперон *rplJL*, а также ген *rpoB*, транскрибируемые под контролем промотора P_{L10} . Установлено [2], что сверхпродукция кодируемой геном *rpoB* β -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* возможна, не сказываясь при этом на жизнеспособности клеток-хозяев. Поэтому можно допустить, что невозможность повышенного синтеза белков, кодируемых полным опероном *rplJL*, определяется геном *rplJ*. Клонирование оперона *rplKA* (плазмиды *pEP16*) также показало возможность получения рекомбинантных *pUC* со *SmaI*-фрагментом только в ориентации, снижающей транскрипцию и, следовательно, экспрессию генов *rplKA*. Показано [22], что присутствие плазмид, обеспечивающих повышенный синтез белка *L1* (ген *rplA*), летально для клеток *E. coli*. По аналогии с *rplJL*-опероном, вероятно, что однонаправленная ориентация фрагмента, содержащего гены *rplKA*, определяется присутствием гена *rplA*. Следовательно, клонирование в плазмиде *pUC* фрагментов, содержащих полные опероны *rplJL* и *rplKA*, возможно в единственной ориентации, при которой экспрессия содержащихся в них генов снижается благодаря конвергентной транс-

крипции, иницируемой P_{lac} вектора. Логично было бы предположить, что в основе однонаправленной ориентации фрагментов, включающих интактные опероны $rplKA$ и $rplJL$, лежит существование и нарушение в случае сверхпродукции белков каждого из оперонов взаимной регуляции активности генов $rplKAJL$. Тем не менее клонирование в pUC $SalGI$ -фрагмента, включающего гены $rplKAJL$ под контролем промоторов P_{L11} и P_{L10} , оказалось невозможным и является, по-видимому, свидетельством сложной взаимной регуляции этого оперона с другими генами (оперонами) *E. coli*.

UNIDIRECTIONAL ORIENTATION OF ESCHERICHIA COLI $rplKAJL$ - $rpoBC$ OPERON FRAGMENTS ON A MULTICOPY pUC PLASMID

E. B. Paton, I. V. Kroupskaya, A. N. Zhyvoloup

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

Summary

A series of recombinant pUC plasmids was constructed to determine the functional domains of the regulatory ribosomal $L10$ protein of *Escherichia coli*, encoded by the $rplJ$ gene. The possibility and peculiarities of cloning of the *E. coli* $rplKAJL$ - $rpoBC$ operon fragments caused by an overproduction of ribosomal proteins in pUC were studied.

1. Lindahl L., Zengel J. M. Ribosomal genes in *Escherichia coli* // Ann. Rev. Genet.—1986.—20.—P. 297—326.
2. Thomas M. S., Nomura M. Translational regulation of the $L11$ ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: mutations that define the target site for repression by $L1$ // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 7.—P. 3085—3096.
3. Nomura M., Gourse R., Baughman G. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components // Ann. Rev. Biochem.—1984.—53.—P. 75—118.
4. Expression of *Escherichia coli* ribosomal protein and RNA polymerase genes cloned on plasmids / N. P. Fiil, D. Bendiak, J. Collins, J. D. Friesen // Mol. and Gen. Genet.—1979.—173, N 1.—P. 39—50.
5. Post-transcriptional regulatory mutants in a ribosomal protein-RNA polymerase operon of *E. coli* / N. P. Fiil, J. D. Friesen, K. L. Dowing, P. P. Dennis // Cell.—1980.—19, N 4.—P. 837—844.
6. The lethal effect of a plasmid resulting from transcriptional read-through of $rplJ$ from the $rplKA$ operon in *Escherichia coli* / J. D. Friesen, G. Ap, N. P. Fiil // Mol. and Gen. Genet.—1983.—189, N 2.—P. 275—281.
7. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду $pUC19$ // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 4.—С. 217—219.
8. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Особенности клонирования фрагментов $rpoBC$ -оперона *Escherichia coli* в плазмидах pUC // Там же.—1987.—3, № 6.—С. 307—312.
9. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Ориентационные эффекты, вызываемые присутствием в плазмиде pUC фрагментов $rplJL$ - $rpoBC$ -оперона *Escherichia coli* // Там же.—1988.—4, № 3.—С. 163—167.
10. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (Fi) as vectors for recombinant DNA — a review // Gene.—1982.—19, N 1.—P. 1—10.
11. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—545 p.
12. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.—1979.—7, N 6.—P. 1513—1523.
13. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—395 с.
14. Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved $M13$ phage cloning vectors and host strains: sequences nucleotide of the $M13mp18$ and $pUC19$ vectors // Gene.—1985.—33, N 1.—P. 103—119.
15. Collins J. Deletions, insertions and rearrangements affecting $rpoB$ gene expression // Mol. and Gen. Genet.—1979.—173, N 1.—P. 217—220.
16. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit β in *Escherichia coli* / L. F. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura, H. Lewis // Proc. Nat. Acad. Sci USA.—1979.—76, N 4.—P. 1697—1701.
17. Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an $M13mp7$ -derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Gene.—1982.—19, N 2.—P. 259—268.
18. RNA secondary structure and translation inhibition: analysis of mutants in the $rplJ$ leader / T. Christensen, M. Johnsen, N. P. Fiil, J. D. Friesen // EMBO J.—1984.—3, N 7.—P. 1609—1612.

19. *Climie S. C., Friesen J. D.* Feedback regulation of the *rplJL-rpoBC* ribosomal operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure // *J. Mol. Biol.*—1987.—198, N 2.—P. 371—381.
20. *Sor F., Bolotin-Fukuhara M., Nomura M.* Mutational alterations of translational coupling in the *L11* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*—1987.—169, N 8.—P. 3495—3507.
21. *Overexpression* and purification of a biologically active rifampicin-resistant subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase / *J. D. McKinney, J. Lee, R. E. O'Neill, A. Goldfarb* // *Gene.*—1987.—58, N 1.—P. 13—18.
22. *Sor F., Nomura M.* Cloning and DNA sequence determination of the *L11* ribosomal protein operon of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris*: translational feedback regulation of the *Escherichia coli* *L11* operon by heterologous *L1* proteins // *Mol. and Gen. Genet.*—1987.—210, N 1.—P. 52—59.

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

Получено 11.05.88

УДК 577.113:633.71

РЕСТРИКЦИОННОЕ КАРТИРОВАНИЕ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК ПЯТИ ВИДОВ *Nicotiana*

И. К. Комарницкий, А. М. Самойлов, Ю. Ю. Глеба

Введение. Хлоропластная (хл) ДНК рода *Nicotiana*, как и большинство хлДНК высших растений, характеризуется наличием двух инвертированных повторов, между которыми находятся большая и малая уникальные последовательности [1]. К настоящему времени определена полная нуклеотидная последовательность хлДНК *N. tabacum* (155844 п. н.) и картирована значительная часть генов тРНК, рибосомных 23S, 16S, 4,5S, 5S РНК, а также генов ряда белков [2]. Выполнена также работа по рестриktionному картированию пластома 17 видов *Nicotiana*. Большинство изменений, найденных в пластома этих видов, явилось, по-видимому, результатом точечных мутаций, малых вставок, делеций и (или) перемещений [3—7].

В настоящей работе приведены результаты рестриktionного картирования еще пяти видов *Nicotiana*, три из которых австралийского — *N. eastii* (*N. eas.*), *N. occidentalis* (*N. occ.*), *N. exigua* (*N. ex.*) — и два американского — *N. undulata* (*N. und.*), *N. chinensis* (*N. chin.*) — происхождения.

Таблица 1

Величина (г. п. н.) и стехиометрия (в скобках) фрагментов хлоропластной ДНК *N. tabacum*, полученных при гидролизе эндонуклеазами рестрикции
Size in kbp and stoichiometry (in brackets) of *N. tabacum* chloroplast DNA fragments produced by *Sat*I, *Pst*I, *Xho*I, *Pvu*II restriction endonucleases

<i>Sat</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Pvu</i> II
27	25	21,9	27,8	42,9
23,8	22,2(×2)	17,9	25,7	19,6
22	18,85(×2)	15,6	17,4	17,5
19,7	9,6	12,7(×2)	11,6(×2)	14,3
16,7	8,25(×2)	11,75	9,5	12,1
15,2	7,0	10,5	8,6	10,3
13,2	5,1(×2)	9,2	8,5	10,0
11,4	4,3	8,9	7,4	8,6
5,6	3,1	5,8	5,3(×2)	6,35
2,9	2,4	5,4	3,6(×2)	4,1(×2)
0,65	1,83	3,8	3,0	3,5
—	1,5(×2)	3,1(×2)	2,9	2,5(×2)
—	1,25	3,0(×3)	2,3	—
—	—	2,6	0,9	—
—	—	1,55	—	—
—	—	0,8(×3)	—	—
—	—	0,7	—	—