

ПРИСУТСТВИЕ СОБСТВЕННОГО ПРОМОТОРА *rpoB*-ГЕНА СНИЖАЕТ СТАБИЛЬНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНЫХ ОДНОНИТЕВЫХ ФАГОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЭТОТ ГЕН

Е. Б. Патон, М. И. Вудмаска, Е. Д. Свердлов

В предыдущем сообщении [1] мы демонстрировали нестабильность рекомбинантных фагов *M13mp8* и *mWB2348*, содержащих фрагмент ДНК, включающий ген *rpoB*, кодирующий β -субъединицу рифампицинустойчивой РНК-полимеразы *E. coli*. Этот фрагмент содержит, кроме того, гены *rplL* и *rplI*, кодирующие рибосомные белки, и два промото-

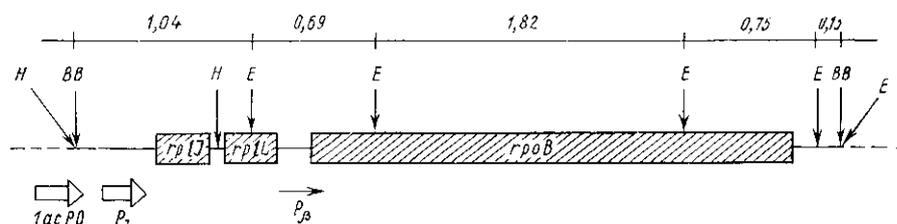


Рис. 1. Физико-генетическая карта фрагмента ДНК *E. coli*, содержащего гены *rpoB*, *rplL* и *rplI* в составе рекомбинантного фага *M13mp9/rpoB*: *lacPO*, P_J и P_B — промоторы; *BB* — место сочленения *BglIII* липких концов фрагмента с *BamHI*-концами векторного фага; *H* и *E* — сайты узнавания рестриктаз *HindIII* и *EcoRI*; заштрихованные участки соответствуют генам *rplI*, *rplL*, *rpoB*. Пунктиром обозначены участки полилинкерной области вектора. Цифры — длины фрагментов в Мдальтонах. Карта представляет собой компиляцию [4—8].

Fig. 1. A physico-genetic map of *E. coli* DNA fragment containing *rpoB*, *rplL* and *rplI* genes as a part of recombinant phage *M13mp9/rpoB*: *lacPO*, P_J , P_B — promoters; *BB* — linkage of *BglIII* sticky ends of the fragment with *BamHI*-ends of the vector phage; *H* and *E* — *HindIII* and *EcoRI* recognition sites; cross-hatched sections denote *rplI*, *rplL*, *rpoB* genes. Dotted line marks the vector polylinker region. Figures designate fragment lengths in MDaltons. Map represents a compilation of [4—8].

ра, один из которых — P_J — является сильным (рис. 1). Было высказано предположение, что одной из причин, вызывающих эту нестабильность, может быть неблагоприятное сочетание двух сильных промоторов *lacUV5* и P_J , программирующих транскрипцию в одном и том же направлении. В данном сообщении показано, что удаление промотора P_J из рекомбинантного фага действительно повышает его стабильность.

Относительные количества устойчивых и чувствительных к рифампицину клеток, трансформированных рекомбинантными фаговыми ДНК, выделенными из рифампицинустойчивых клеток *E. coli*

Relative Amount of Rifampicin Resistant and Rifampicin Sensitive Cells Transformed with Recombinant Phages Isolated from Rifampicin Resistant *E. coli* Cells

Фаг-вектор	Количество анализированных колоний	Количество рифампицинустойчивых колоний	Рифампицинустойчивые колонии, %
<i>mp9/rpoB</i>	250	89	35
<i>mp9/rpoB</i> без P_J	250	14	5

Для того, чтобы выщепить промотор P_J , нами был сконструирован рекомбинантный фаг *mp9/rpoB*, физико-генетическая карта участка которого приведена на рис. 1. Видно, что промотор P_J находится в участке ДНК, ограниченном двумя *HindIII*-сайтами, один из которых находится в области вставки, а другой — в полилинкерной области векторного фага. Поскольку в ДНК рекомбинантного фага находятся лишь эти два сайта узнавания *HindIII*, мы использовали расщепление именно этой эндонуклеазой рестрикции для удаления промотора P_J из фаговой ДНК.

Конструирование рекомбинантного фага *mp9/rpoB* проводили, как описано в [1]. Выделение фаговых ДНК, их расщепление эндонуклеазами рестрикции, гель-электрофорез в агарозных гелях и электроэлюцию фрагментов проводили по методикам, описанным в [2]. Смесь для гидролиза ДНК рекомбинантного фага *mp9/rpoB* рестриктазой *HindIII* включала 20 мкг фаговой ДНК. Продукты гидролиза разделяли гель-элект-

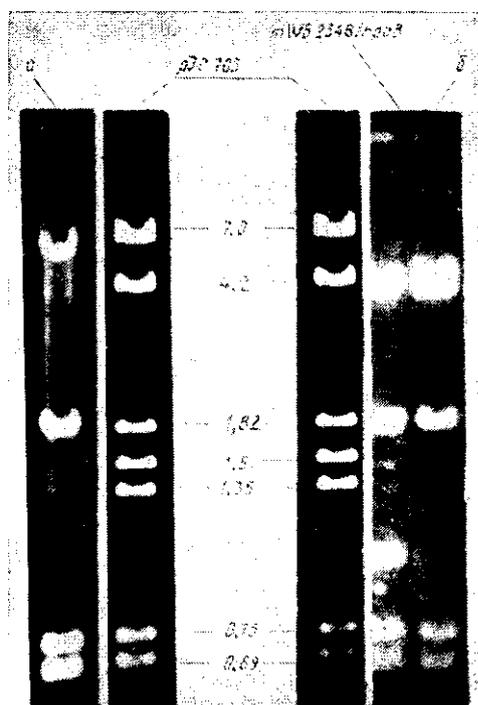


Рис. 2. Картина электрофоретического разделения в 0,8 %-ном агарозном геле продуктов расщепления рестриктазой *EcoRI* ДНК рекомбинантных фагов *M13mp9/rpoB* с P_J -промотором (а) и без него (б). В качестве реперов использованы плазмиды *pIC703* [8] и рекомбинантный фаг *mWB2348/rpoB* [1], расщепленные *EcoRI*.

Fig. 2. The picture of electrophoretic separation in 0.8 % agarose gel of *EcoRI* cleavage products of recombinant phages *M13mp9/rpoB* with (a) and without (b) the P_J promoter. *EcoRI*-cleaved plasmid *pIC703* [8] and recombinant phage *mWB2348/rpoB* [1] re-combinant phage are used as markers.

рофорезом. После лигирования и последующей трансформации клеток *E. coli* образующейся рекомбинантной фаговой ДНК об удалении промоторсодержащего фрагмента судили по отсутствию его в продуктах рестрикции *EcoRI* ДНК, анализируемых путем гель-электрофореза в 0,8 %-ном агарозном геле.

На рис. 2 представлена картина электрофоретического разделения получаемых в результате расщепления *EcoRI* ДНК рекомбинантных фагов *mp9/rpoB* с промотором P_J (а) и без него (б).

Для определения стабильности использовали то обстоятельство, что клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантные фаги, являются рифампицинустойчивыми. Клетки *E. coli* *K12 71-18* ($\Delta lac pro/F' \Delta M15 ic pro$) [3] трансформировали ДНК рекомбинантного фага и определяли отношение количества рифампицинчувствительных полунегативных колоний к общему числу колоний. Как видно из таблицы, относительное количество рифампицинчувствительных клонов существенно ниже в случае рекомбинантов, лишенных P_J -промотора.

Таким образом, действительно, сочетание двух однонаправленных промоторов каким-то образом неблагоприятно сказывается на стабильности рекомбинантных молекул. Это может быть связано как со слишком сильной транскрипцией генов [9], содержащихся во встроенном фрагменте, так и с какими-либо другими факторами.

THE STABILITY OF RECOMBINANT FILAMENTOUS PHAGES
IS REDUCED IN THE PRESENCE OF THE *rpoB* GENE PROMOTER

E. B. Paton, M. I. Woodmaska, E. D. Sverdlov

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

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

Summary

A fragment of DNA including the *rpoB* gene coding for the β -subunit of rifampicin-resistant RNA-polymerase of *E. coli* and *rplL* and *rplI* genes encoding ribosomal protein synthesis as well as two promoters P_J and P_B was cloned into the filamentous *M13mp9* phage. The stability of the recombinant phages was shown to increase as the result of the elimination of the strong P_J promoter.

1. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13mp8* и *mWB2348*.— Биоорг. химия, 1984, 10, № 11, с. 1544—1547.
2. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.— N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982.—545 p.
3. Barnes W. M., Bevan M. Kilo-sequencing: an ordered strategy for rapid DNA sequence data acquisition.— Nucl. Acids Res., 1983, 11, N 2, p. 349-367.
4. Messing J. An integrative strategy of DNA sequencing and experiments beyond.— In: Recombinant DNA: Third Cleveland Symp. on macromolecules / Ed. A. Walton.— Amsterdam: Elsevier, 1981, p. 143-153.
5. The molecular biology catalogue.— Uppsala: Pharmacia P-L biochemicals, 1983.—43 p.
6. Morgan B. A., Kellet E., Hayward R. S. The wild-type nucleotide sequence of the *rpoBC*-attenuator region of *Escherichia coli* DNA, and its implications for the nature of the *rif^r* 18 mutation.— Nucl. Acids Res., 1984, 12, N 13, p. 5465-5470.
7. Evidence that rifampicin can stimulate readthrough of transcriptional terminators in *Escherichia coli*, including the attenuator of the *rpoBC* operon / A. J. Newman, J.-Ch. Ma, K. M. Howe et al.— Nucl. Acids Res., 1982, 10, N 22, p. 7409—7424.
8. Collins J. Deletions, insertions and rearrangements affecting *rpoB* gene expression.— Mol. and Gen. Genet., 1979, 173, N 1, p. 217—220.
9. Remaut E., Sfanssens P., Fiers W. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the P_L promoter of coliphage λ .— Gene, 1981, 15, N 1, p. 81—93.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т биоорг. химии им. М. М. Шемякина
АН СССР, Москва

Получено 21.12.84