

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-

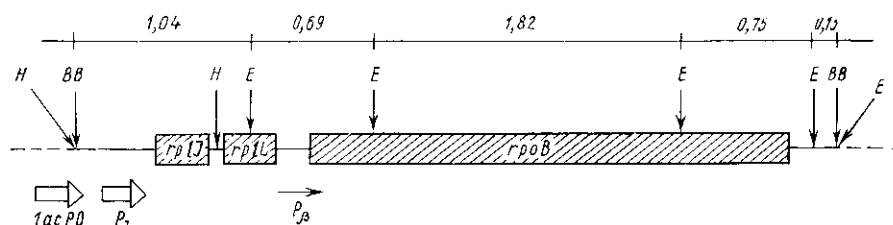


Рис. 1. Физико-генетическая карта фрагмента ДНК *E. coli*, содержащего гены *rpoB*, *rplL* и *rplI* в составе рекомбинантного фага *M13mp9/rpoB*: *lacPO*, P_J и P_B — промоторы; *BB* — место сочленения *BglIII* липких концов фрагмента с *BamHI*-концами векторного фага; *H* и *E* — сайты узнавания рестриктаз *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 ана- лизированных колоний | Количество ри- фампицинуств- ительных коло- ний | Рифампицин- чувствительные 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-

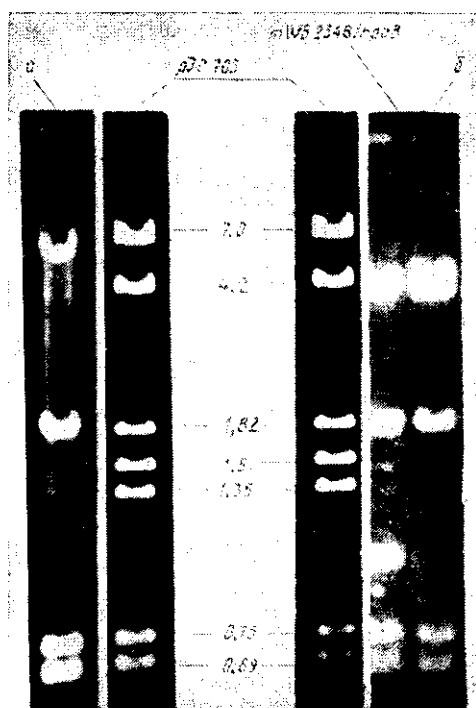


Рис. 2. Картина электрофоретического разделения в 0,8 %-ном агарозном геле продуктов расщепления рестриктазой *EcoRI* ДНК рекомбинантных фагов *M13mp9/rpoB* с P_J -промотором (а) и без него (б). В качестве реперов использованы плазмиды *pC703* [8] и рекомбинантный фаг *mWB2348/rpoB* [1], расщепленные *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 *pC703* [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

S u m m a r y

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