

4. Hinnebusch A. G., Fink G. R. Repeated DNA sequences upstream from *HIS1* also occur at several other co-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 8.—P. 5238—5247.
5. Struhl K. Constitutive and regulatory promoter: evidence for two distinct molecular mechanisms // Molecular biology of yeast / Ed. J. Hicks.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1985.—P. 361.
6. Manisala P., Zalkin H. Nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae ADE4* gene encoding glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 13.—P. 8478—8484.
7. Ген *ADE2* дрожжей: первичная структура и рекомбинационное картирование / А. С. Краев, М. В. Миронова, К. В. Саснаускас и др. // 16-я Конф. ФЕБО: Тез. докл.—М., 1984.—С. 382.

ЛГУ им. А. А. Жданова

Получено 2.01.85

УДК 577.214.622

ПРИСУТСТВИЕ ДВУХ СИЛЬНЫХ ПРОМОТОРОВ ОПРЕДЕЛЯЕТ ОРИЕНТАЦИЮ ФРАГМЕНТА ДНК ПРИ ВСТРАИВАНИИ В ПЛАЗМИДУ *pUC19*

Е. Б. Патон, А. Н. Живолуп, Л. А. Вараница

В предыдущих сообщениях [1, 2] мы показали, что встраивание гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидных фагах (производные фага *M13*) происходит однонаправленно и приводит к образованию нестабильных рекомбинантных фагов. Было также установлено, что стабильность фагов увеличивается при удалении сильного промотора P_{β} , содержащегося во встроеном фрагменте ДНК. Для выяснения причин, вызывающих однонаправленную ориентацию данного фрагмента и нестабильность рекомбинантных фагов, нам представлялась целесообразной попытка клонирования данного фрагмента ДНК, включающего гены *rpoB*, *rplI* и *rplL* вместе с промоторами P_{β} и $P_{\beta'}$, направляющими транскрипцию этих генов, в плазмиде *pUC19*, сочетающей в себе свойства *pBR322* и фага *M13mp19*.

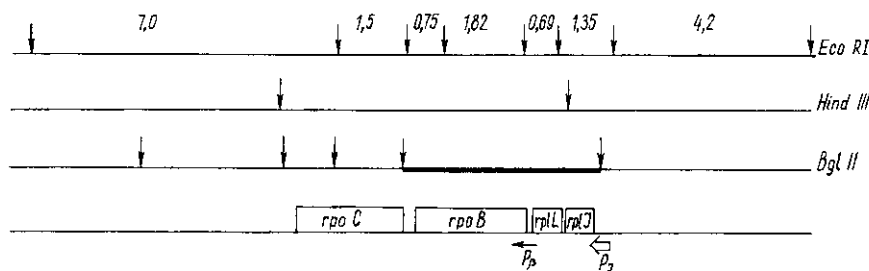


Рис. 1. Физико-генетическая карта космиды *pJC703*. *rpoB*, *rpoC*, *rplI*, *rplL* — гены, кодирующие синтез β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* и рибосомных белков *L10* и *L7/L12* соответственно. Стрелками обозначены сайты узнавания рестриктазами *EcoRI*, *HindIII* и *BamHI*. Клонированный в *pUC19* *BglIII*-фрагмент выделен жирной линией. Цифрами обозначены величины фрагментов в Мдальтонах.

Fig. 1. A physico-genetic map of the cosmid *pJC703*. *rpoB*, *rpoC*, *rplI*, *rplL* — genes encoding β and β' subunits of *E. coli* rRNA polymerase and ribosomal proteins *L10* and *L7/L12*, respectively. P_{β} and $P_{\beta'}$ — promoters. Arrows mark recognition sites for *EcoRI*, *HindIII* and *BamHI*. The cloned *BglIII* fragment is given in bold line. Figures designate fragments' length (MDalton).

Источником клонируемого *BglIII*-фрагмента ДНК послужила космида *pJC703* [3], физико-генетическая карта которой приведена на рис. 1. 0,8 мкг плазмиды *pJC703*, расщепленной рестриктазой *BglIII*, лигировали с 0,3 мкг расщепленной *BamHI* ДНК *pUC19* и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli JM101* [4]. Реакции рестрикции, лигирования, получение компетентных клеток и трансформацию их проводили по стандартным методикам, описанным в [5]. Для отбора рекомбинантных клонов *E. coli* мы воспользовались тем обстоятельством, что клонируемый ген

rpoB содержит доминантную мутацию устойчивости к рифампицину *rpoB3*, что позволяет рифампицинчувствительным клеткам *E. coli JM101*, трансформированным рекомбинантными плазмидами, расти на среде, содержащей рифампицин. После перекола ампициллинустойчивых трансформантов на среду, содержащую 100 мкг/мл рифампицина, для дальнейшего анализа было отобрано 20 клонов. Для подтверждения наличия вставки и определения ее ориентации плазмидную ДНК, выделенную из этих клонов, подвергали расщеплению рестриктазой *EcoRI* и анализировали с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле. Как видно из рис. 1, концевые *EcoRI*-субфрагменты клонированного *BglII*-фрагмента значительно отличаются по массе ($10,4 \cdot 10^5$ и $1,3 \cdot 10^5$), и это обстоятельство позволяет легко определить ориентацию встроенного фрагмента ДНК. Проведенный анализ показал, что, как и в случае клонирования в нитевидных фагах,



Рис. 2. Электрофорез в 1 %-ном агарозном геле продуктов расщепления рестриктазой *EcoRI* рекомбинантных плазмид *pUC19/rpoB* с промотором P_J (3) и без него (2); плазмиды *pUC19* (1) и космиды *pJC703* (4).

Fig. 2. An 1 % agarose gel electrophoresis of *EcoRI* cleaved *pUC19/rpoB* recombinant plasmids containing (3) and lacking (2) the P_J promoter; *pUC19* plasmids (1) and *pJC703* cosmids (4).

встраивание указанного *BglII*-фрагмента в плазмиду *pUC19* происходит однонаправленно — картина расщепления *EcoRI* всех выделенных рекомбинантных плазмидных ДНК совпадала и соответствовала представленной на рис. 2, а. Такое положение

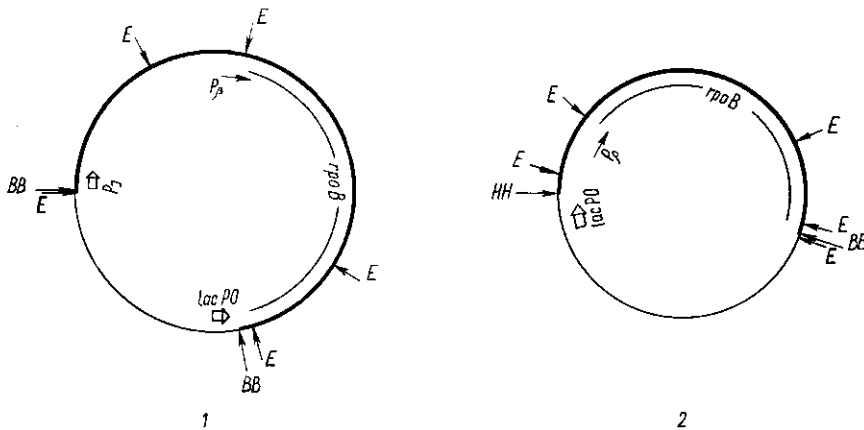


Рис. 3. Рекомбинантные плазмиды *pUC19/rpoB*, содержащие *BglII*-фрагмент с промотором P_J (1) и без него (2). *E* — сайты узнавания *EcoRI*. *BB*, *HH* — места сочленения липких концов, образованных при расщеплении рестриктазами *BglII/BamHI* и *HindIII* соответственно.

Fig. 3. Recombinant plasmids *pUC19/rpoB* containing the *BglII*-fragment with (1) and without (2) the P_J promoter. *E* — sites for *EcoRI* recognition. *BB*, *HH* — sites of conjunction of *BglII/BamHI* and *HindIII* sticky ends.

встроенного фрагмента означает, что промоторы *lacUV5*, находящийся в *pUC19*, и P_J — во встроенном фрагменте, ориентированы таким образом, что инициируют транскрипцию во встречном направлении. Следует отметить, что такая ориентация клонированного *BglII*-фрагмента противоположна ориентации его в рекомбинантных нитевидных фагах [1]. Причины этого различия не ясны и в настоящее время исследуются. Стабильность полученных рекомбинантных плазмид, которую установили, как и в случае рекомбинантных фагов, определением отношения рифампицинустойчивых колоний, полученных после повторной трансформации рекомбинантной плазмидной ДНК, к общему числу колоний, равнялась 100 %.

Известно, что клонирование сильных промоторов сопряжено с определенными трудностями [6, 7], поэтому в качестве одной из причин, вызывающих однонаправленную ориентацию *BglII*-фрагмента в рекомбинантных плазмидах, можно предположить не-

благоприятное сочетание двух сильных однонаправленных промоторов *lacUV5* и P_J . Если это так, то в случае удаления одного из этих промоторов стала бы возможной противоположная ориентация гена *rpoB* в составе рекомбинантной плазмиды. Наличие уникального сайта узнавания рестриктазой *HindIII* в клонируемом фрагменте, расположенном в гене *rplJ* [3, 8], делает удобным удаление промотора P_J . Для получения рекомбинантной плазмиды с удаленным промотором P_J ДНК *pUC19* расщепляли сначала рестриктазой *HindIII* и, убедившись в полноте рестрикции с помощью трансформации, проводили гидролиз ее рестриктазой *BamHI*. Продукты гидролиза лигировали с ДНК *pJC703*, расщепленной совместно рестриктазами *HindIII* и *BglII*. После трансформации в результате процедуры, аналогичной вышеописанной, были отобраны рифампицинустойчивые клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды с удаленным промотором P_J . Анализ продуктов расщепления таких плазмид рестриктазой *EcoRI* с помощью электрофореза в агарозном геле приведен на рис. 2. Как можно видеть на рис. 2 и 3, отсутствие фрагмента *EcoRI* с молекулярной массой $10 \cdot 10^5$ свидетельствует об удалении промотора P_J , находившегося в этом фрагменте, а также о новой ориентации гена *rpoB* в сконструированной рекомбинантной плазмиде. Стабильность таких плазмид была 100 %.

Таким образом, нами сконструированы рекомбинантные плазмиды *pUC19/rpoB* с промотором P_J и без него. Показано, что в обоих случаях признак устойчивости к рифампицину, сообщаемый клеткам *E. coli* такими плазмидами, стабильно поддерживается в них. Показано, что встраивание фрагмента, содержащего ген *rpoB*, происходит однонаправленно, но противоположно направлению его в рекомбинантных нитевидных фагах — таким образом, что промоторы *lacUV5* и P_J инициируют транскрипцию во встречном направлении. Удаление промотора P_J делает возможной обратную ориентацию *rpoB*-гена в рекомбинантной плазмиде.

THE PRESENCE OF TWO STRONG PROMOTERS DETERMINES THE ORIENTATION OF A DNA FRAGMENT INSERTED INTO *pUC19* PLASMID

E. B. Paton, A. N. Zhyvoloup, L. A. Varanitsa

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

Summary

Recombinant plasmids *pUC19/rpoB* with and without the P_J promoter were constructed. For both plasmids stability was of 100 %. In obtained recombinant plasmids containing the P_J promoter the inserted *BglII* fragment was oriented identically and in such a way that transcription from the *lacUV5* and P_J promoters was initiated in counter direction. Removal of the P_J promoter made the opposite orientation of the *rpoB* gene in recombinant plasmids possible.

1. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13mp8* и *mWB2348* // Биоорганическая химия.— 1984.— 10, № 11.— С. 1544—1547.
2. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Присутствие собственного промотора *rpoB*-гена снижает стабильность рекомбинантных одонитевых фагов, содержащих этот ген // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 3.— С. 160—162.
3. Collins J. Deletions, insertions and rearrangements affecting *rpoB* gene expression // Mol. and Gen. Genet.— 1979.— 173, N 1.— P. 217—220.
4. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (Ff) as vectors for recombinant DNA — a review // Gene.— 1982.— 19, N 1.— P. 1—10.
5. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor, 1982.— 545 p.
6. Вельков В. В. Нестабильность рекомбинантных молекул // Генетика.— 1983.— 19, № 10.— С. 1573—1581.
7. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal // R. Gentz, A. Langner, A. C. Y. Chang et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 8.— P. 4936—4940.
8. Morgan B. A., Kellert 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^r418* mutation // Nucl. Acids Res.— 1984.— 12, N 13.— P. 5465—5470.

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

Получено 6.02.86