



УДК 577.214.022

ВСТРАИВАНИЕ ФРАГМЕНТА ДНК МЕЖДУ ДВУМЯ СИЛЬНЫМИ ОДНОНАПРАВЛЕННЫМИ ПРОМОТОРАМИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПИТЕВИДНОГО ФАГА *mp8*₁/*rpoB* УВЕЛИЧИВАЕТ ЕГО СТАБИЛЬНОСТЬ И ДЕЛАЕТ ВОЗМОЖНОЙ ПРОТИВОПОЛОЖНУЮ ОРИЕНТАЦИЮ В НЕМ КЛОНИРУЕМОГО ГЕНА *rpoB* *E. coli*

Е. Б. Патон, А. Н. Живолуп

Ранее мы сообщали [1, 2], что при клонировании *Bgl*II-фрагмента ДНК, содержащего ген *rpoB* *E. coli*, в питевидном фаге *M13*, встраивание его происходит однонаправленно и приводит к образованию нестабильных рекомбинантных фагов. Предполагалось, что причиной нестабильности и однонаправленности могло быть наличие двух сильных промоторов — *lacUV5* и *P_J*, инициирующих транскрипцию в одинаковом направлении. Удаление одного из них — *P_J* — действительно повысило стабильность рекомбинантных фагов на 30 % [3]. Известно [4], что последовательное встраивание сильного терминатора транскрипции сделало возможным клонирование сильного промотора бактериофага *T5*. Учитывая это, в данной работе была предпринята попытка повысить стабильность рекомбинантных питевидных фагов со встроенным геном *rpoB* *E. coli* путем разделения промоторов *lacUV5* и *P_J* фрагментом ДНК фага лямбда, содержащим терминатор транскрипции и концевую часть гена *oor*-РНК [5]. Для выделения указанного фрагмента ДНК фага лямбда была использована рекомбинантная плазмида *pBR322* со встроенным фрагментом *EcoRI*-*G* фага λ [5], полученная нами из лаборатории Е. Д. Свердлова (ИВХ АН СССР). После препаративного гидролиза этой плазмиды рестриктазой *EcoRI* фрагмент *EcoRI*-*G* выделяли путем электрофореза в 0,8 %-ном агарозном геле, адсорбции на полоску Whatman DE 81 и последующей элюции с нее, как описано в [6]. Далее ДНК выделенного фрагмента расщепляли рестриктазой *Sau3A1* и продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 7 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Элюцию из геля *Sau3A1*-*G* фрагмента (193 п. о.), содержащего концевую часть гена и терминатор транскрипции *oor*-РНК фага лямбда, проводили, как указано в [7]. Для встраивания вышеуказанного *Sau3A1*-фрагмента в репликативную форму (РФ) фага *M13mp8* последнюю расщепляли рестриктазой *EcoRI*. Далее липкие концы *mp8* и *Sau3A1*-фрагмента достраивали с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E. coli* и проводили лигирование их по стандартной методике [7]. После трансформации клеток *E. coli* 71-18 [8] аликвотами лигазной смеси клоны, содержащие рекомбинантные фаговые ДНК, отбирали путем гибридизации с радиоактивным зондом. Клетки *E. coli* из образовавшихся в результате трансформации фаговых бляшек переносили на чашки с LB [8] агаром, а затем на нитроцеллюлозные фильтры BA 85/23 фирмы «Schleicher & Schüll», ФРГ. В качестве радиоактивного зонда использовали плазмиду *pBR322* со встроенным *EcoRI*-фрагментом фага λ . Введение радиоактивной метки проводили с помощью реакции ник-трансляции, используя стандартные растворы, ДНК-полимеразу и α -[³²P]дЦТФ (111 ТБк/ммоль) фирмы «Amersham» (Англия) по протоколу этой фирмы (Nick-translation kit). Прегибридизацию, гибридизацию с радиоактивным зондом (10^6 имп·мин⁻¹·мкг⁻¹ инкубационной смеси) осуществляли при 42 °С в течение 18 ч. Фильтры отмывали при 68 °С. Вышеуказанные процедуры проводили, как указано в [7].

По результатам гибридизации было отобрано два клон *E. coli*, обладающих положительным сигналом. Для подтверждения наличия клонированного *Sau3A1*-фрагмента РФ фаговой ДНК, выделенную из этих клонов, расщепляли рестриктазой *PvuII* и

атализировали электрофорезом в 6 %-ном ПААГ. РФ векторного фага *mp8* содержит 1711 сайта узнавания рестриктазой *PvuII* [9] и расщепляется ею на фрагменты 6835, 301 и 93 п. о. Включение *Sau3AI*-фрагмента (193 п. о.) приводит к увеличению длины *PvuII*-фрагмента с 301 до 494 п. о. Электрофорез продуктов расщепления выделенных рекомбинантных фагов *mp8*₁₀ рестриктазой *PvuII* приведен на рис. 1. *PvuII*-фрагмент



494 п. о. имели оба рекомбинантных фага. Для определения ориентации встроеного *Sau3AI*-фрагмента мы использовали рестриктазу *HindIII*, расщепляющую клонированный *Sau3AI*-фрагмент на субфрагменты длиной 120 и 73 п. о. Расщепление же *HindIII* рекомбинантного фага приводит к присоединению к одному из этих фрагментов 18 п. о. участка векторной ДНК и образованию таким образом двух *HindIII*-фрагментов величины 7307 и 138 п. о., или 7351 и 91 п. о., в зависимости от ориентации встроеного фрагмента. Картина расщепления обоих рекомбинантных фагов *mp8*₁₀ рестриктазой *HindIII* совпадала, соответствовала приведенной на рис. 1, б и свидетельствовала об образовании *HindIII*-фрагмента 138 п. о. Это означало, что направление транскрипции *oop*-РНК фага λ противоположно направлению транскрипции, инициируемо-

Рис. 1. Электрофорез в 6 (а) и 8 % (б) ПААГ продуктов расщепления рекомбинантных фаговых ДНК рестриктазами *PvuII* (1) и *HindIII* (2). В качестве маркерной использована ДНК *pBR322*, расщепленная рестриктазой *BspRI* (фрагменты: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 104, 89, 80, 64, 57 п. о.).

Fig. 1. Electrophoresis in 6 % (a) and 8 % (б) PAAG of *PvuII* (1) and *HindIII* (2) cleaved recombinant phage DNAs. *BspRI*-digested *pBR322* was used as a marker (fragments: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 104, 89, 80, 64, 57 bp).

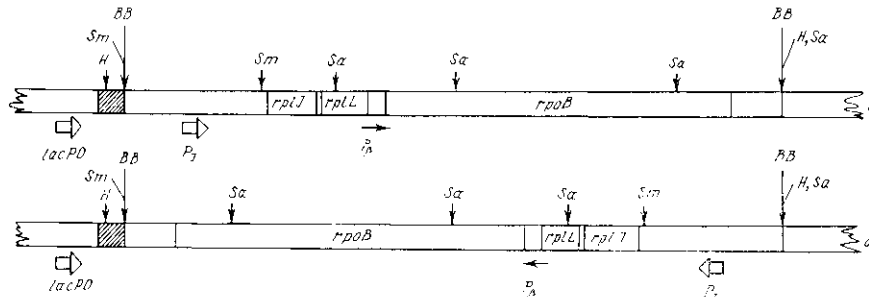


Рис. 2. Две возможные ориентации *BglIII*-фрагмента в рекомбинантном фаге *mp8*₁₀/*rpoB*. *Sa*, *Sm*, *H* - сайты расщепления рестриктазами *SalGI*, *SmaI* и *HindIII*. *BB* - место сочленения липких концов *BamHI* (*mp8*₁₀) и *BglIII* (клонированного фрагмента). *Sau3AI*-фрагмент фага лямбда, клонированный в *mp8*, заштрихован.

Fig. 2. Two possible orientations of the *BglIII* fragment in recombinant *mp8*₁₀/*rpoB* phage. *Sa*, *Sm*, *H* - sites of *SalGI*, *SmaI* and *HindIII* digestion. *BB* - a site of conjunction of *BamHI* (*mp8*₁₀) and *BglIII* (cloned fragment) sticky ends. The *Sau3AI*-fragment of lambda phage cloned into *mp8* is hatched.

му на промоторе *lacUV5* фага *mp8*, тем не менее нам представлялась интересной попытка клонирования в полученном рекомбинантном фаге *mp8*₁₀ *BglIII*-фрагмента космиды *pC703* [10], содержащего ген *rpoB* *E. coli*. Расщепление векторной ДНК рестриктазой *BamHI* и лигирование ее с вышеуказанным *BglIII*-фрагментом проводили, как описано ранее [1]. После трансформации клеток *E. coli* отобрали один рифампицинуустойчивый клон и исследовали его стабильность и ориентацию встроеного *BglIII*-фрагмента. Для подтверждения наличия встроеного *BglIII*-фрагмента и определения его ориентации выделенную рекомбинантную ДНК расщепляли рестриктазами *SmaI* и *SalGI*. Расположение сайтов узнавания этими рестриктазами при двух альтернативных положениях клонированного *BglIII*-фрагмента показано на рис. 2. Как можно было определить по картине электрофореза в 1 %-ном агарозном геле продуктов расщепления *SmaI*, наблюдалось образование фрагмента величиной $\sim 3,5 \cdot 10^6$, а в случае *SalGI* - $\sim 1,3 \cdot 10^6$ (рис. 3). Учитывая асимметричное расположение сайтов расщепления этими рестриктазами на

клонированном *BglII*-фрагменте, наблюдаемая картина соответствовала такой ориентации, при которой направление транскрипции, инициируемой на промоторах *lacUV5* и P_J , противоположно.

Определение стабильности сконструированного рекомбинантного фага, проведенное, как описано ранее [1], показало, что она возросла до 93 %.

Таким образом, конструирование рекомбинантного питевидного фага $mp8_{t_0}$, содержащего *Sau3A1*-фрагмент фага λ с терминатором транскрипции *oop*-РНК, и последующее клонирование в нем *BglII*-фрагмента *pJC703*, включающего ген *rpoB*, позволило повысить стабильность рекомбинантных фагов $mp8_{t_0}/rpoB$ и встроить указанный *BglII*-фрагмент в ориентации, противоположной наблюдаемой ранее. Оба обнаруженных факта согласуются с предположением о влиянии двух сильных однонаправленных промоторов на стабильность рекомбинантных фагов и ориентацию в них клонированного *BglII*-фрагмента.



Рис. 3. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле продуктов расщепления рекомбинантного фага $mp8_{t_0}/rpoB$ рестриктазами *SalGI* (1) и *SmaI* (2). В качестве маркера использована космида *pJC703*, (3), расщепленная рестриктазой *EcoRI* (фрагменты: 7,0; 4,2; 1,82; 1,5; 1,35; 0,75 и 0,69 Мд).

Fig. 3. 1 % agarose gel electrophoresis of *SalGI* (1) and *SmaI* (2) digested recombinant phase $mp8_{t_0}/rpoB$. *pJC703* cosmid cleaved by *EcoRI* (fragments: 7.0, 4.2, 1.82, 1.5, 1.35, 0.75, 0.69 Md) was used as a marker (3).

INSERTION OF A DNA FRAGMENT BETWEEN TWO STRONG SIMILARLY ORIENTED PROMOTERS OF RECOMBINANT FILAMENTOUS PHAGE $mp8_{t_0}/rpoB$ INCREASES ITS STABILITY AND MAKES POSSIBLE AN OPPOSITE ORIENTATION OF THE CLONED *E. coli rpoB* GENE

E. B. Paton, A. N. Zhivolup

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

Summary

A fragment of λ phage DNA containing terminator of transcription (t_0) and terminal part of the *oop*-RNA gene was inserted into the polylinker area of *M13 mp8* filamentous phage. The obtained phage was used to clone a *BglII* fragment of *pJC703* cosmid, containing *E. coli* genes *rplI*, *rplL* and *rpoB* together with promoters P_J and P_B . Stability of the obtained $mp8_{t_0}/rpoB$ recombinant phages increased up to 93 % and an orientation of the cloned *BglII*-fragment opposite to the previously observed one became possible.

1. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в питевидные фаги *M13mp8* и *M13WB2348* // Биорг.-хим. химия. — 1984. — 10, № 11. — С. 1544—1547.
2. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli*, клонированного в питевидные фаги *M13* // Макромолекулы в функционирующей клетке: Гез. докл. IV симпоз. СССР — Италия. — Киев, 1984. — С. 89.
3. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Присутствие собственного промотора *rpoB*-гена снижает стабильность рекомбинантных однонитевых фагов, содержащих этот ген // Биополимеры и клетка. — 1985. — 1, № 3. — С. 160—162.
4. 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.
5. Primary structure of an *EcoRI* fragment of λ imm 434 DNA containing regions *cl-cro* of phage 434 and *clI-o* of phage lambda / Yu. A. Ovchinnikov, S. O. Guryev, A. S. Kravayev et al. // Gene. — 1979. — 6, N 2. — P. 235—249.
6. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide

- gels / I. Dretgen, M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon // *Anal. Biochem.*— 1981.— 112, N 2. — P. 295—298.
7. *Munitatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning — a laboratory manual. — New York : Cold Spring Harbor, 1982.—545 p.
 8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976.—436 с.
 9. *Beck E., Zink B.* Nucleotide sequence and genome organization of filamentous bacteriophages *f1* and *fd* // *Gene.* — 1981.—16, N 1. — P. 35—58.
 10. *Collins J.* Deletions, insertions and rearrangements affecting *rpoB* gene expression // *Mol. and Gen. Genet.* — 1979.—173, N 1. — P. 217—220.

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

Получено 15.02.86

Окончание. Начало см. на с. 270—274.

19. *Ochi K.* Protoplast fusion // *Molecular breeding and genetics of applied microorganisms* / Eds K. Sakaguchi, M. Okanishi. — New York : Acad. press, 1980. — P. 88—94.
20. *Lurquin P., Sheely R., Rao N.* Quantitative aspects of nucleic acid sequestration in large liposomes and their effects on plant protoplast // *FEBS Lett.* — 1981.—25, N 2.— P. 183—187.
21. *Weisman G., Cohen C., Hoffstein S.* Introduction of enzymes by means of liposomes, into non-phagocytic human cells *in vitro* // *Biochim. et biophys. acta.* — 1977.—498, N 2. — P. 375—385.
22. *Маргулис Л. Б., Нейфах А. А.* Взаимодействие липосом с клетками. Липосомы с жидкокристаллической мембраной // *Успехи соврем. биологии.* — 1982.—93, № 2.— С. 211—229.

Ин-т микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного АН УССР, Киев

Получено 22.07.85