



УДК 577.214.622

ВЫСОКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО НИТЕВИДНОГО ФАГА M13 СО ВСТРОЕННЫМ УЧАСТКОМ *rpoBC*-ОПЕРОНА *Escherichia coli*

А. Н. Живолуп, Е. Б. Патон

В ранее опубликованных работах [1, 2] нами было показано, что встраивание в нитевидный фаг M13 4,5·10⁴-участка *rpoBC*-оперона *E. coli*, включающего полные гены *rplL*, *rplJ* и *rpoB* (рибосомные белки L7/L12, L10 и β-субъединица РНК-полимеразы соответственно), а также части генов *rplA* и *rpoC* (рибосомный белок L1 и β'-субъединица РНК-полимеразы), с промоторами, определяющими транскрипцию всех этих генов, приводит к образованию нестабильных рекомбинантов. Учитывая особенности строения встраиваемого фрагмента (наличие в нем сильного промотора *P_L* и аттенуатора [3, 4], одностороннюю ориентацию его в рекомбинантных фагах M13 [1, 2], данные об отрицательном влиянии сильных промоторов на стабильность рекомбинантных молекул [5, 6], полученные нами данные о повышении стабильности рекомбинантных фагов M13mp9 в случае удаления из указанного фрагмента ДНК сильного промотора *P_L*

[7]), мы считали целесообразной попытку повышения стабильности рекомбинантных фагов путем удаления промотора *lac* из состава вектора M13mp8 и последующего клонирования в нем описанного выше фрагмента ДНК *E. coli*.

С целью выщелачивания из векторной молекулы фрагмента, содержащего промотор *lac*, 1 мкг ДНК M13mp8 обрабатывали эндонуклеазой

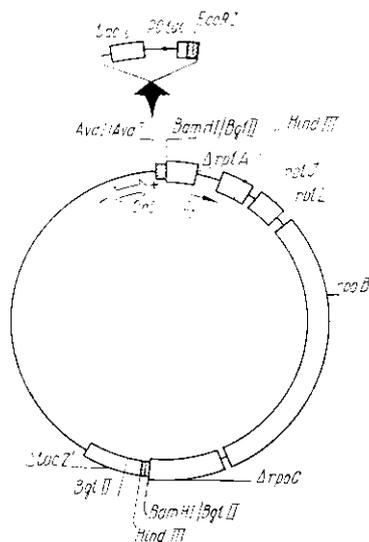


Рис. 1. Рестрикционная и генетическая карта рекомбинантного фага M13mp8 с удаленным *lac* промотором и встроеным участком *rpoBC*-оперона *E. coli*. Стрелка указывает на удаленный из векторной ДНК *AvaI*-фрагмент. Полилинкерная область векторного фага заштрихована

Fig. 1. Restriction and genetic map of the recombinant M13mp8 phage with eliminated *lac* promoter and inserted part of the *E. coli rpoBC* operon. Black arrow indicates the eliminated *AvaI*-fragment. The polylinker area of the vector phage is hatched

рестрикции *AvaI* и после лигирования продуктов расщепления трансформировали полученной ДНК компетентные клетки *E. coli JM101* [8]. Все вышеуказанные процедуры выполняли по стандартным методикам [9]. Отбор клеток, содержащих векторные молекулы измененной структуры, вели на индикаторной среде с X-gal и ИПТГ [8]. Для подтверждения предполагаемого изменения векторов (удаления *AvaI*-фрагмента, содержащего промотор *lac*) репликативную форму (РФ) ДНК фагов из клеток, проявляющих *Lac*⁻-фенотип, выделяли щелочным лизисом [10] и после совместного расщепления рестриктазами *EcoRI* и *BglIII* анализировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Как видно из рис. 1, удаление *AvaI*-фрагмента фага M13mp8 приводит к исчезновению *EcoRI*-сайта полилинкерной области. Выделение содержащего часть *rpoBC*-оперона *E. coli BglIII*-фрагмента ДНК комиды *pJC703* [11], встраивание его в

*Bam*HI-сайт полученного векторного фага и отбор рекомбинантов проводили аналогично [1]. В результате были отобраны 15 рекомбинантных фагов. Для определения ориентации встроеного *Bgl*III-фрагмента РФ ДНК этих клонов расщепляли рестриктазой *Hind*III, учитывая, что вектор и встроеныый фрагмент содержат по одному сайту рестрикции этим ферментом (рис. 1). Как показал электрофоретический анализ продуктов этого расщепления (рис. 2), наблюдалось образование фрагментов ДНК $5,25 \cdot 10^6$ и $3,68 \cdot 10^6$ у всех клонов, что свидетельствует об однонаправленной ориентации вставки, приведенной на рис. 1. Проверку стабильности сконструированного рекомбинантного



Рис. 2. Электрофорез в 1 %-ном горизонтальном агарозном геле расщепленных *Hind*III РФ ДНК рекомбинантных фагов. В качестве маркерной использована расщепленная *Bgl*III ДНК космиды *p*C703. Цифрами обозначены величины образующихся фрагментов в млн. Да.

Fig. 2. 1 % horizontal agarose gel electrophoresis of the *Hind*III digested recombinant phages' RF DNAs. *Bgl*III digested *p*C703 cosmid DNA is used as a marker. Figures designate for fragments' length in millions of daltons

нитевидного фага, включающего участок *rpoBC*-оперона *E. coli*, проводили, как описано ранее [1], повторной трансформацией компетентных клеток *E. coli* JM101 РФ рекомбинантного фага, выделенной равновесным центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия [9]. Сохранение устойчивости к рифампицину 298 из 300 повторных трансформантов (*rpoB*-ген клонированного *Bgl*III-фрагмента содержит доминантную мутацию устойчивости *rpoB3* к этому антибиотику) указывает на высокую (~99 %) стабильность полученных рекомбинантных фагов.

HIGH STABILITY OF A RECOMBINANT FILAMENTOUS M13 PHAGE WITH AN INSERTED PART OF THE *ESCHERICHIA COLI* *RPOBC* OPERON

A. N. Zhyvoloup, E. B. Paton

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

Summary

A part of the *E. coli* *rpoBC* operon containing recombinant phage with increased stability was obtained, the *M13mp8* vector filamentous phage with eliminated *lac* promoter being the origin of it.

1. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13 mp8* и *mWB2348* // Биоорг. химия.— 1984.— 10, № 11.— С. 1544—1547.
2. Paton E. B., Woodmaska M. I., Sverdlov E. D. Unidirectional orientation of *E. coli* *rpoB* gene cloned into *M13* filamentous phages // Macromolecules in the functioning cell: Proc. of the 4th Soviet—Italian symp.— Pushchino, 1986. — P. 69—74.
3. Ma I.-Ch, Newman A. I., Hayward R. S. Internal promoters of the *rpoBC* operon of *Escherichia coli* // Mol. and Gen. Genet.— 1981.— 184, N 2.— P. 548—550.
4. 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^r18* mutations // Nucl. Acids Res.— 1984.— 12, N 13.— P. 5465—5470.
5. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal // R. Gentz, A. Langer, A. C. Y. Chang et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 8.— P. 4936—4940.
6. Вельков В. В. Нестабильность рекомбинантных молекул // Генетика.— 1983.— 19, № 10.— С. 1573—1581.

7. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Присутствие собственного промотора *groB*-гена снижает стабильность рекомбинантных однонитевых фагов, содержащих этот ген // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 3.— С. 160—162.
8. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (F1) as vectors for recombinant DNA — a review // Gene.— 1982.— 19, N 1.— P. 1—10.
9. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor, 1982. — 545 p.
10. 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.
11. Collins J. Deletions, insertions and rearrangements affecting *groB* gene expression // Mol. and Gen. Genet.— 1979.— 173, N 1. — P. 217—220.

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

Получено 29.01.87

Окончание. Начало см. на с. 215—220.

-
13. Olashaw N. E., Kress E. D., Cristofalo V. J. Thymidine triphosphate synthesis in senescent W 138 cells // Exp. Cell Res.— 1983.— 149, N 2.— P. 347—354.
 14. Transfer of purified HSV thymidine kinase gene to cultured mouse cells / M. Wigler, S. Silverstein, L. S. Lee et al. // Cell.— 1977.— 11, N 1.— P. 223—232.
 15. Захарян Р. А. Ген-транспорт *in vivo* и его регуляция глюкокортикоидами // Структура и транскрипция генома: Тез. докл. IV симпоз. СССР—ФРГ.— Ереван, 1981.— С. 19.
 16. Qasba P. K., Aposhian H. V. DNA and gene therapy: transfer of mouse DNA to human and mouse embryonic cells by polyoma pseudovirions // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1971.— 68, N 10.— P. 2345—2349.

Ин-т эксперим. биологии АН АрмССР, Ереван

Получено 15.09.85