



УДК 577.214.622:578.56:577.152.314

ОДНОНАПРАВЛЕННАЯ ОРИЕНТАЦИЯ ГЕНА  
*groV* В *E. coli* ПРИ КЛОНИРОВАНИИ В НИТЕВИДНЫЕ ФАГИ M13mp8  
И M13WB2348

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

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев;  
\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

В процессе изучения функциональной топографии субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* нами были предприняты попытки клонирования соответствующих генов в векторы M13mp8 [1] и M13WB2348 [2, 3], которые являются производными фага M13. В данной работе приводятся результаты клонирования в эти фаги фрагмента ДНК *E. coli*, содержащего ген *groV*, кодирующий  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы, а также гены *rplJ* и *rplL*, кодирующие рибосомные белки L7/L12 и L10, вместе с промоторами, определяющими транскрипцию этих генов. Показано, что при клонировании этого фрагмента в двух разных векторах они встраиваются таким образом, что направление транскрипции с собственных промоторов фрагмента совпадает с направлением транскрипции, инициируемой с *lacUV5*-промотора. В обоих случаях рекомбинантные фаги неустойчиво поддерживают признак рифампицинустойчивости, кодируемый фрагментом, в штамме *E. coli* 71-18.

Для клонирования в одноцепочечный фаг гена *groV*  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* был выбран его вариант с доминантной мутацией устойчивости к рифампицину *groV3*, содержащейся в фаге *hrif<sup>A</sup>18* и в сконструированной Д. Коллинсом космиде rJC703 [4]. Фрагмент, включающий в себя полный ген *groV*, а также гены *rplJ* и *rplL*, был выделен из плазмиды rJC703 после ее расщепления рестрикционной экзонуклеазой *BglII*. Липкие концы, образующиеся в результате расщепления ДНК этой рестрикционной экзонуклеазой, идентичны липким концам, образующимся при расщеплении экзонуклеазой *BamHI*. Это обстоятельство было использовано для клонирования фрагмента в векторный нитевидный фаг M13mp8 [1]. Реplikативную форму ДНК фага (RF) расщепляли в полилинкерной области с помощью *BamHI* и затем лигировали с *BglII*-фрагментом, содержащим ген *groV*. Поскольку мутация *groV3* доминантна, можно было ожидать, что трансфицированные рекомбинантным фагом клетки будут устойчивы к рифампицину. Действительно, при переносе полунегативных бляшек, образовавшихся после высева трансфекционной смеси на питательный агар без рифампицина, на среду с рифампицином (вплоть до 600 мкг/мл) значительная часть колоний (~95%) оказывается способной к росту с образованием позитивных клонов. Эта устойчивость к рифампицину обусловлена наличием в клетке гибридного фага, поскольку выделенная из таких клеток RF ДНК после трансфекции рифампицинчувствительных клеток придает им рифампицинустойчивость (см. ниже).

Рекомбинантные RF ДНК из 30 рифампицинустойчивых клонов были подвергнуты анализу путем расщепления экзонуклеазой рестрикции *EcoRI* для определения наличия требуемого фрагмента и его ориентации. Две возможные ориентации фрагмента в рекомбинантных фаговых ДНК изображены на рис. 1 а, б. В первой из этих ориентаций после расщепления рекомбинантной плазмиды следует ожидать образования пяти фрагментов с длинами 4,83; 1,82; 1,05; 0,75 и 0,69 МДа, тогда как при противоположной ориентации длины образующихся пяти фрагментов должны составить 5,74; 1,82; 0,75; 0,69 и 0,14 МДа. Картины, наблюдавшиеся при расщеплении всех 30 рекомбинантных ДНК, были совершенно одинаковы и соответствовали первой ориентации, как можно видеть для семи из них

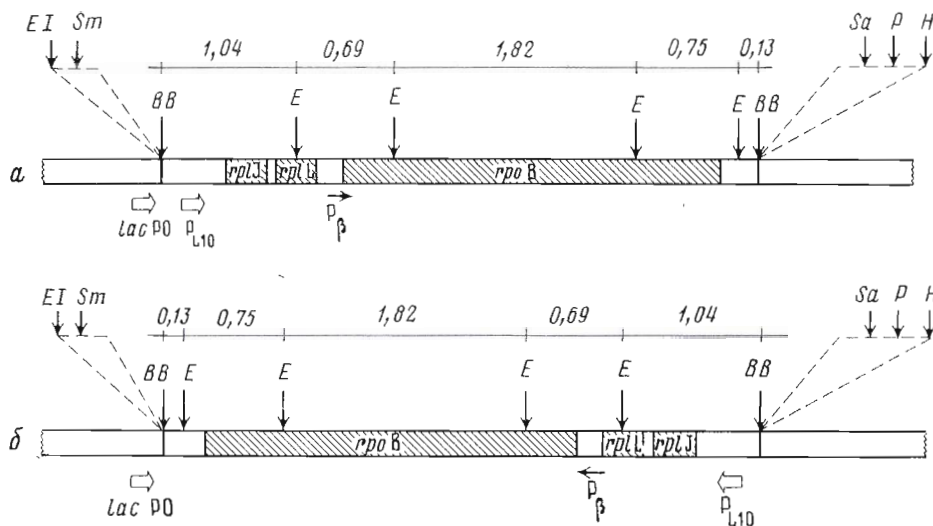


Рис. 1. Рестрикционная и генетическая карта *Bgl*II-фрагмента *E. coli*, содержащего гены *rplJ*, *rplL* и *rpoB*, встроеного в *Bam*HI-сайт полилинкерной области фага M13mp8 или в *Bgl*II-сайт полилинкерной области фага M13WB2348, в ориентации, когда направление транскрипции с собственных промоторов фрагмента совпадает (а) или противоположно (б) направлению транскрипции с *lacUV5*-промотора векторного фага. *EI* — уникальный *Eco*RI-сайт векторных фагов, содержащийся в линкерной области; *E* — *Eco*RI-сайты, содержащиеся во встраиваемом фрагменте; *Sm*, *Sa*, *P* и *H* — сайты эндонуклеаз *Sma*I, *Sal*I, *Pst*I и *Hind*III, содержащиеся в линкерной области; *BB* — место сочленения *Bgl*II-липких концов встраиваемого фрагмента и *Bam*HI-липких концов M13mp8 или *Bgl*II-концов M13WB2348. *lacPO*, *P<sub>L10</sub>*, *P<sub>β</sub>* — промоторы. Стрелки указывают направление транскрипции, инициируемой обозначенным промотором. Стрелка над *P<sub>β</sub>* означает, что это слабый промотор. Пунктир — участки векторного полилинкера. Цифры означают длины фрагментов в млн. дальтон. Карта представляет собой компиляцию данных [1, 2, 4, 5]

на рис. 2. При этой ориентации направление транскрипции, инициируемой на *lacUV5*-промоторе фага и на собственных промоторах *P<sub>L10</sub>* и *P<sub>β</sub>*, содержащихся во фрагменте и обеспечивающих транскрипцию генов *rplJ*, *rplL* и *rpoB* [4, 6, 7], одинаково. Причины такой избирательности неясны и в настоящее время исследуются.

Необходимо обратить внимание на еще один существенный момент, связанный со свойствами рекомбинантных фаговых ДНК, содержащих исследуемый кластер генов. Если рифампицинустойчивые клетки, инфицированные рекомбинантным фагом, вырастить в присутствии рифампицина и выделить из них RF- или SS-формы ДНК или фаг и ввести их в свежие рифампицинчувствительные клетки *E. coli*, то только часть (~65%) трансфектантов оказывается рифампицинустойчивой, тогда как значительное количество клеток содержит фаг и тем не менее чувствительна к рифампицину (таблица). Образование *rif<sup>s</sup>*-трансфектантов, очевидно, связано с какими-то перестройками гена *rpoB* в составе рекомбинантных фагов. Длина встроеного в фаг *Bgl*II-фрагмента довольно велика — 4,43 МДа. Известно, что с увеличением длины чужеродного фрагмента, входящего в состав рекомбинантных фагов M13, составляющих семейство векторов mp2, mp7, mp8 и mp9, их стабильность уменьшается [8].

Недавно Барнес и Бивен [2, 3] предложили другой вариант вектора на основе M13, в котором благодаря встраиванию чужеродных фрагментов в другой участок вектора значительно повышается устойчивость высокомолекулярных рекомбинантов. Мы провели встраивание *Bgl*II-фрагмента с генами *rplJ*, *rplL* и *rpoB* в *Bgl*II-сайт полилинкера этого нового вектора M13WB2348 и исследовали ориентацию и стабильность полученных рекомбинантов. Все RF ДНК из исследованных 20 колоний при расщеплении рестрикционной эндонуклеазой *Eco*RI давали картину, идентичную приведенной на рис. 2, и, следовательно, имели ориентацию, представлен-

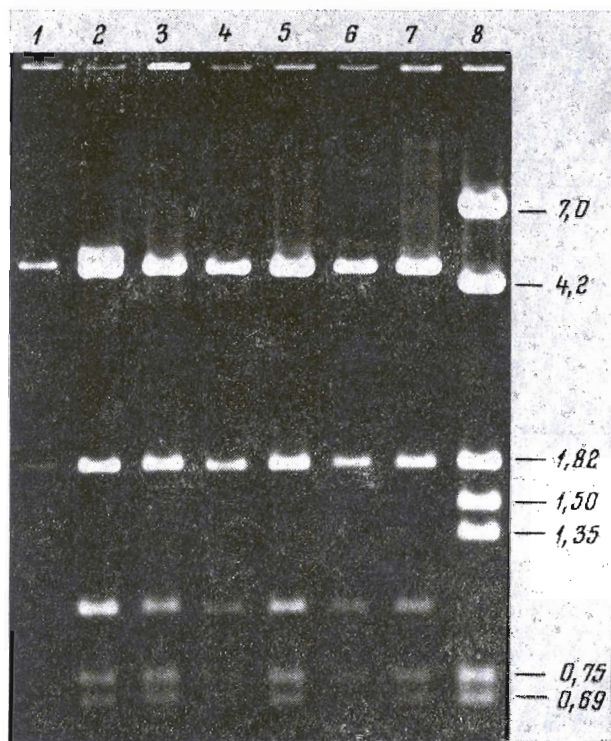


Рис. 2. Электрофоретическое разделение фрагментов, получаемых после расщепления RF ДНК рекомбинантного фага M13mp8 - *rpoB* рестрикционной эндонуклеазой *Eco*RI в 0,8% агарозном геле. 1-7 - *rif*<sup>r</sup>-клоны фага; 8 - расщепление эндонуклеазой рестрикции *Eco*RI плазмиды pJC703 (указаны величины образующихся фрагментов в млн.дальтон)

ную на рис. 1 а. Стабильность рекомбинантных ДНК в этом случае была выше: только 12% клонов, полученных после повторной трансфекции рекомбинантными ДНК из *rif*<sup>r</sup>-колоний, имели *rif*<sup>s</sup>-фенотип (таблица). Однако даже в этом случае фон нестабильности признака *rif*<sup>r</sup> достаточно высок и затрудняет работу с такими рекомбинантами. Оба обнаруженные в работе факта - и однонаправленная ориентация фрагмента в рекомбинантных фагах, и нестабильность *rif*<sup>r</sup>-признака в них - ставят вопрос о механизме этих явлений, выяснение которого позволило бы получить необходимые для функциональных исследований стабильные рекомбинанты.

#### Экспериментальная часть

Бактериальный штамм *E. coli* 71-18 ( $\Delta lac pro/Flac\Delta M15i^+pro$ ) и фаг M13mp8 [1] любезно предоставлены проф. В. Мюллер-Хиллом (Институт генетики, Кёльн, ФРГ). Нитевидный фаг M13WB2348 [2, 3] любезно предоставлен доктором М. Бивеном (Вашингтонский университет, Сент-Луис, США). *Bgl*II-фрагмент ДНК, содержащий ген *rpoB* с мутацией доминантной устойчивости к рифампицину, а также гены *rplI* и *rplL*, выделен из плазмиды pJC703 [4], любезно предоставленной Д. Коллинсом (Брауншвейг, ФРГ).

Рестрикционные эндонуклеазы *Bam*HI, *Bgl*II и *Eco*RI выделяли по описанным методам.

Выделение фаговых и плазмидных ДНК, их расщепление рестрикционными эндонуклеазами, гель-электрофорез в агарозных гелях и электроэлюцию фрагментов проводили как описано в работе [9]. Трансфекцию *E. coli* 71-18 фаговыми ДНК проводили по методам, описанным в работах [10], и трансфицированные клетки высевали на чашки Петри с LB-агаром [11]. Для проверки устойчивости полученных трансфектантов к рифампицину колонии из полупрозрачных бляшек, образующихся на

**Относительные количества чувствительных к рифампицину клеток, трансфицированных рекомбинантными ДНК или рекомбинантными бактериофагами, выделенными из рифампицинустойчивых клеток *E. coli***

Фаг-вектор	Количество анали- зированных колоний	Количество чувствительных колоний	% чувствительных колоний
M13mp8	300	105	35
M13WB2348	300	38	12

ровном бактериальном газоне, перекачивали на чашки с LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл рифампицина. Стабильность рекомбинантной ДНК в полученных трансфектантах определяли следующим образом: устойчивые к рифампицину клетки выращивали в LB-среде в присутствии 100 мкг/мл рифампицина, выделяли репликативную форму [12] или фаг [8], полученной ДНК или фагом трансфицировали клетки *E. coli* 71-18, трансфектанты высевали на LB-агар, как описано выше, и количество рифампицинучувствительных трансфектантов определяли после переколов на LB-агар с рифампицином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Messing J. In: Third Cleveland Symposium on macromolecules: Recombinant DNA / Ed. Walton A. Elsevier, Amsterdam, 1981, p. 143-153.
2. Barnes W. M., Bevan M. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 2, p. 349-367.
3. Barnes W. M., Bevan M., Son P. H. In: Methods. Enzymol., 1983, v. 101, p. 98-122.
4. Collins J. Mol. Gen. Genet., 1979, v. 173, № 1, p. 217-220.
5. Howe K. M., Newman A. J., Garner I., Wallis A., Hayward R. S. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 22, p. 7425-7438.
6. Scaife J. G., Goman M., Linn T., Heilig J., Rowen L., Calendar R. In: Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosomes / Eds Osawa S., Ozeiki H., Uchida H., Yura T. Elsevier, Amsterdam et al., 1980, p. 3-20.
7. Scaife J. In: RNA polymerase / Eds Losic R., Chamberlin M. Cold Spring Harbor Laboratory, 1976, p. 207-225.
8. Zinder N. D., Boeke Y. D. Gene, 1982, v. 19, № 1, p. 1-10.
9. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. In: Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 98-186.
10. Hayes R. C., LeClerc J. E. Gene, 1983, v. 21, № 1, p. 1-8.
11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 395.
12. Birnboim H. C., Dolly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513-1523.

Поступила в редакцию  
12.IV.1984

**UNIDIRECTIONAL ORIENTATION OF *rpoB* GENE OF *E. coli*  
CLONED INTO FILAMENTOUS PHAGES M13mp8 AND M13WB2348**

PATON E. B., WOODMASKA M. I., SVERDLOV E. D.\*

*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*

*E. coli* DNA fragment containing the *rpoB* gene with an *rpoB3* rifampicin resistance dominant mutation (coding for the  $\beta$ -subunit of RNA polymerase), genes *rplJ* and *rplL* coding for the ribosomal proteins L7/L12 and L10, and promoters determining transcription of all these genes were cloned in M13mp8 and WB2348 filamentous phages. *E. coli* cells containing recombinant phages acquired resistance to rifampicin up to its 600  $\mu\text{g/ml}$  concentration. When cloned into M13mp8 and WB2348 phages, the given fragment is oriented in such a way that the direction of the transcription initiated from its own promoter coincides with that initiated from the *lac* UV5 promoter. In both cases the recombinant phages have no stable rifampicin resistance which is coded by the fragment.