



УДК 577.152.277.6'152 : 577.242.3 : 547.963.32.04

РНК-ПОЛИМЕРАЗА ФАГА Т7: КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА
И ЕГО СТРУКТУРА

Грачев М. А., Шлетнев А. Г.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Осуществлено клонирование в плазмидном векторе гена 1.0 бактериофага Т7, кодирующего фагоспецифическую РНК-полимеразу. Один из полученных клонов, *E. coli* K-12 HB101 (pSK-T7-1.0a), осуществляет экспрессию гена 1.0, судя по тому, что его экстракт стимулирует синтез РНК на матрице Т7-ДНК в присутствии рифампицина. Анализ первичной структуры фрагментов гена 1.0, выделенных из плазмиды pSK-T7-1.0a, позволил уточнить последовательность нуклеотидов этого гена, установленную недавно одновременно и независимо авторами настоящей работы и другими исследователями. Другая рекомбинантная плаزمида, pSK-T7-1.0b, по данным рестрикционного картирования, не отличалась от упомянутой выше, однако она не индуцировала синтез рифампицинустойчивой РНК-полимеразы. Оказалось, что в гене 1.0, находящемся в составе этой плазмиды, делегирован один из остатков тимидина.

Для исследования механизмов транскрипции на молекулярном уровне нужно знать первичную структуру ферментов, осуществляющих этот процесс. Недавно достигнут крупный успех — расшифрована полная первичная структура РНК-полимеразы *E. coli* [1—4], одного из самых сложных ферментов, который состоит из пяти субъединиц и имеет молекулярную массу ~500 000. Вместе с тем значительный интерес представляет структура и более простых РНК-полимераз, к числу которых относится РНК-полимераза, индуцируемая бактериофагом Т7. Этот фермент состоит из одной субъединицы с молекулярной массой ~100 000. Несмотря на такую относительную простоту, он выполняет все главные функции РНК-полимераз: специфично взаимодействует с промоторами, осуществляет высокоэффективный синтез РНК и терминацию этого синтеза [5—7].

Очевидно, РНК-полимераза *E. coli* устроена гораздо сложнее потому, что в ходе функционирования в клетке она должна подвергаться воздействию множества регуляторных факторов. Фаговая полимеразы, по-видимому, не нуждается в таких регуляторных воздействиях и поэтому содержит в своем составе лишь те элементы структуры, которые необходимы для выполнения упомянутых основных функций. Это обстоятельство делает изучение РНК-полимеразы Т7 особенно интересным.

Недавно нами было опубликовано краткое сообщение [8] о полной первичной структуре гена 1.0 фага Т7, кодирующего РНК-полимеразу Т7. Одновременно и независимо эту структуру расшифровали Шталь и Зинн [9]. Оказалось, что между двумя опубликованными последовательностями имеется ряд различий. В нашем исследовании [8] мы получали рестрикционные фрагменты гена 1.0 непосредственно из Т7-ДНК, не прибегая к технике клонирования. Из-за большой протяженности генома Т7 некоторые из этих фрагментов оказалось трудно выделить из гидролизатов, и ряд участков структуры поэтому удалось определить лишь по одной из двух комплементарных цепей ДНК. Недостаточно надежно была изучена также структура в области «стыков» некоторых сайтов рестрикции.

Аналогичные затруднения, вероятно, встречались и в работе Штала и Зинна [9]. В отличие от нас они полностью основывали свое исследование на использовании клонирования. Исходный материал для клонирования гена 1.0 был получен ими путем гибридизации ДНК двух делеционных мутантов фага Т7 и последующей обработки гетеродуплекса нуклеазой S₁.

MspI

TCG CGC TGC ACT GGC GTA ATG CTG ACC GGA TGG CTA TCG CTA ATG GTC TTA CGC TCA ACA

C

TTG ATA AGC AAC TTG ACG CAA TGT TAA TGG GCT GAT AGT CTT ATC TTA CAG GTC ATC TGC

3180

BspI *R(10)*

GGG TGG CCT GAA TAG GTA CGA TTT ACT AAC TGG AAG AGG CAC TAA ATG AAC ACG ATT AAC
Met Asn Thr Ile Asn

ATC GCT AAG AAC GAC TTC TCT GAC ATC GAA CTG GCT GCT ATC CCG TTC AAC ACT CTG GCT
Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala

3300

BspI

GAC CAT TAC GGT GAG CGT TTA GCT CGC GAA CAG TTG GCC CTT GAG CAT GAG TCT TAC GAG
Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu

ATG GGT GAA GCA CGC TTC CGC AAG ATG TTT GAG CGT CAA CTT AAA GCT GGT GAG GTT GCG
Met Gly Glu Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val Ala

3420

GAT AAC GCT GCC GCC AAG CCT CTC ATC ACT ACC CTA CTC CCT AAG ATG ATT GCA CGC ATC
Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys Met Ile Ala Arg Ile

AAC GAC TGG TTT GAG GAA GTG AAA GCT AAG CGC GGC AAG CGC CCG ACA GCC TTC CAG TTC
Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe

3540

MspI

CTG CAA GAA ATC AAG CCG GAA GCC GTA GCG TAC ATC ACC ATT AAG ACC ACT CTG GCT TGC
Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys

CTA ACC AGT GCT GAC AAT ACA ACC GTT CAG GCT GTA GCA AGC GCA ATC GGT CGG GCC ATT
Leu Thr Ser Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala Ile

3660

GAG GAC GAG GCT CGC TTC GGT CGT ATC CGT GAC CTT GAA GCT AAG CAC TTC AAG AAA AAC
Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys His Phe Lys Lys Asn

GTT GAG GAA CAA CTC AAC AAG CGC GTA GGG CAC GTC TAC AAG AAA GCA TTT ATG CAA GTT
Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val

3780

GTC GAG GCT GAC ATG CTC TCT AAG GGT CTA CTC GGT GGC GAG GCG TGG TCT TCG TGG CAT -
Val Glu Ala Asp Met Leu Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность *l*-цепи ДНК фага Т7 в районе гена 1.0 и аминокислотная последовательность РНК-полимеразы Т7. Стрелками указаны места расщеплений эндонуклеаз рестрикции *BspI* и *MspI*, R(1.0) — место расщепления РНКазы III. В рамки взяты последовательность промотора Ø1.1А РНК-полимеразы фага Т7 и промотора С бактериальной РНК-полимеразы. Подчеркнута последовательность, комплементарная 3'-концу 16S РНК рибосом, и кодон терминации трансляции

Очевидно, что такой подход в принципе может приводить к возникновению различий между структурами исходной и клонированной ДНК. Необходимо особо отметить, что в работе Штала и Зинна [9] нет данных об экспрессии РНК-полимеразы Т7 в созданном ими плазмидном штамме.

В связи с изложенным нам представлялось необходимым дополнительно исследовать структуру гена 1.0 с целью ее уточнения. В настоящей ра-

MspI
↓

AAG GAA GAC TCT ATT CAT GTA GGA GTA CGC TGC ATC GAG ATG CTC ATT GAG TCA ACC GGA
Lys Glu Asp Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr Gly

3900

ATG GTT AGC TTA CAC CGC CAA AAT GCT GGC GTA GTA GGT CAA GAC TCT GAG ACT ATC GAA
Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp Ser Glu Thr Ile Glu

CTC GCA CCT GAA TAC GCT GAG GCT ATC GCA ACC CGT GCA GGT GCG CTG GCT GGC ATC TCT
Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser

4020

CCG ATG TTC CAA CCT TGC GTA GTT CCT CCT AAG CCG TGG ACT GGC ATT ACT GGT GGT GGC
Pro Met Phe Gln Pro Cys Val Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly

TAT TGG GCT AAC GGT CGT CGT CCT CTG GCG CTG GTG CGT ACT CAC AGT AAG AAA GCA CTG
Tyr Trp Ala Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala Leu

4140

ATG CGC TAC GAA GAC GTT TAC ATG CCT GAG GTG TAC AAA GCG ATT AAC ATT GCG CAA AAC
Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile Asn Ile Ala Gln Asn

4200

ACC GCA TGG AAA ATC AAC AAG AAA GTC CTA GCG GTC GCC AAC GTA ATC ACC AAG TGG AAG
Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala Val Ala Asn Val Ile Tyr Lys Trp Lys

MspI ↓ ↓ *HspI*

CAT TGT CCG GTC GAG GAC ATC CCT GCG ATT GAG CGT GAA GAA CTC CCG ATG AAA CCG GAA
His Cys Pro Val Glu Asp Ile Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu

4320

GAC ATC GAC ATG AAT CCT GAG GCT CTC ACC GCG TGG AAA CGT GCT GCC GCT GCT GTG TAC
Asp Ile Asp Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val Tyr

CGC AAG GAC AGG GCT CGC AAG TCT CGC CGT ATC AGC CTT GAG TTC ATG CTT GAG CAA GCC
Arg Lys Asp Arg Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe Met Leu Glu Gln Ala

BspI
↓

AAT AAG TTT GCT AAC CAT AAG GCC ATC TGG TTC CCT TAC AAC ATG GAC TGG CGC GGT CGT
Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg

GTT TAC GCC GTG TCA ATG TTC AAC CCG CAA GGT AAC GAT ATG ACC AAA GGA CTG CTT ACG
Val Tyr Ala Val Ser Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr

4560

CTG GCG AAA GGT AAA CCA ATC GGT AAG GAA GGT TAC TAC TGC CTG AAA ATC CAC GGT GCA
Leu Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly Ala

боте мы с помощью нового метода, отличного от метода Штала и Зинна [9], получили исходный материал для клонирования гена 1.0; осуществили клонирование этого материала в плазмиде pSK [10]; показали, что один из полученных клонов экспрессирует активную РНК-полимеразу Т7. Далее мы получили из плазмиды активного штамма рестрикционные фрагменты гена 1.0 и определили последовательность нуклеотидов в тех участках, где наблюдались различия между структурой [8] и структурой Штала и Зинна [9]. Была проведена также повторная расшифровка структуры ряда других рестрикционных фрагментов ДНК фага Т7, полученных без использования клонирования. Все это позволило уточнить структуру гена 1.0, надежность определения которой, очевидно, достаточно высока, так

AAC TGT GCG GGT GTC GAT AAG GTT CCG TTC CCT GAG CGC ATC AAG TTC ATT GAG GAA AAC
Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys Phe Ile Glu Glu Asn

4680

CAC GAG AAC ATC ATG GCT TGC GCT AAG TCT CCA CTG GAG AAC ACT TGG TGG GCT GAG CAA
His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln

BspI

GAT TCT CCG TTC TGC TTC CTT GCG TTC TGC TTT GAG TAC GCT GGG GTA CAG CAC CAC GGC
Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly

4800

CTG AGC TAT AAC TGC TCC CTT CCG CTG GCG TTT GAC GGG TCT TGC TCT GGC ATC CAG CAC
Leu Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln His

HpaI

TTC TCC GCG ATG CTC CGA GAT GAG GTA GGT GGT CCG GCG GTT AAC TTG CTT CCT AGT GAG
Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu

4920

ACC GTT CAG GAC ATC TAC GGG ATT GTT GCT AAG AAA GTC AAC GAG ATT CTA CAA GCA GAC
Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp

GCA ATC AAT GGG ACC GAT AAC GAA GTA GTT ACC GTG ACC GAT GAG AAC ACT GGT GAA ATC
Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile

5040

TCT GAG AAA GTC AAG CTG GGC ACT AAG GCA CTG GCT GGT CAA TGG CTG GCT CAC GGT GTT
Ser Glu Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala His Gly Val

ACT CGC AGT GTG ACT AAG CGT TCA GTC ATG ACG CTG GCT TAC GGG TCC AAA GAG TTC GGC
Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly

HspI

5160

TTC CGT CAA CAA GTG CTG GAA GAT ACC ATT CAG CCA GCT ATT GAT TCC GGC AAG GGT CCG
Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Pro

ATG TTC ACT CAG CCG AAT CAG GCT GCT GGA TAC ATG GCT AAG CTG ATT TGG GAA TCT GTG
Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val

5280

AGC GTG ACG GTG GTA GCT GCG GTT GAA GCA ATG AAC TGG CTT AAG TCT GCT GCT AAG CTG
Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys Leu

5340

CTG GCT GCT GAG GTC AAA GAT AAG AAG ACT GGA GAG ATT CTT CGC AAG CGT TGC GCT GTG
Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg Lys Arg Cys Ala Val

как исследование проводилось двумя независимыми лабораториями с использованием различных подходов. Наконец, изучив первичную структуру одного из участков гена 1.0 в составе рекомбинантной плазмиды pSK-T7-1.0b, не индуцирующей синтез РНК-полимеразы T7, мы установили, что на этом участке делетирован один из остатков тимидиловой кислоты.

Уточненная структура гена 1.0 приведена на рис. 1. Нумерация нуклеотидов от левого конца T7-ДНК дана в соответствии с результатами Даина и Штудиера [7], которые недавно опубликовали полную первичную структуру T7-ДНК (структура гена 1.0 в этой публикации приводится со ссылкой на данные Шталя и Зинна [9]). Осуществленная в рамках настоящего исследования перепроверка структуры гена 1.0 показала, что в положениях 3856, 3860, 3937, 3938, 4106, 4165, 4165, 4194, 4198, 4199, 4210, 4244,

CAT TGG GTA ACT CCT GAT GGT TTC CCT GTG TGG CAG GAA TAC AAG AAG CCT ATT CAG ACG
His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr

5460

CGC TTG AAC CTG ATG TTC CTC GGT CAG TTC CGC TTA CAG CCT ACC ATT AAC ACC AAC AAA
Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys

GAT AGC GAG ATT GAT CCA CAC AAA CAG GAG TCT GGT ATC GCT CCT AAC TTT GTA CAC AGC
Asp Ser Glu Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His Ser

5580

CAA GAC GGT AGC CAC CTT CGT AAG ACT GTA GTG TGG GCA CAC GAG AAG TAC GGA ATC GAA
Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu Lys Tyr Gly Ile Glu

MspI

TCT TTT GCA CTG ATT CAC GAC TCC TTC GGT ACC ATT CCG GCT GAC GCT GCG AAC CTG TTC
Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe

5700

AAA GCA GTG CGC GAA ACT ATG GTT GAC ACA TAT GAG TCT TGT GAT GTA CTG GCT GAT TTC
Lys Ala Val Arg Glu Thr Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe

MspI

TAC GAC CAG TTC GCT GAC CAG TTG CAC GAG TCT CAA TTG GAC AAA ATG CCA GCA CTT CCG
Tyr Asp Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu Pro

5820

GCT AAA GGT AAC TTG AAC CTC CGT GAC ATC TTA GAG TCG GAC TTC GCG TTC GCG TAA CGC
Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe Ala Phe Ala

0 1, 2 4

BspI

CAA ATC AAT ACG ACT CAC TAT AGA GGG ACA ACA AAC TCA AGG TCA TTC GCA AGA GTG GCC

4265, 4735, 4747, 5146, 5323, 5327, 5363, 5388 верна структура Штала и Зинна, а не опубликованная нами ранее структура [8]. На этих различиях мы останавливаться более не будем. Данные об уточнении структуры на других участках, где мы считаем нашу последовательность (рис. 1) правильной, подробно рассматриваются ниже.

Клонирование гена 1.0 Т7-ДНК было решено осуществить в составе ДНК плазмиды рСК, сконструированной на основе вектора рВР 322 для клонирования промоторсодержащих фрагментов [10]. Эта плазида отличается от плазмиды рВР 322 тем, что в районе промотора P_{Tc} в ней удален короткий *aluI*-фрагмент (15 н.п.). В результате делеции, нарушающей инициацию транскрипции с промотором P_{Tc} , клетки *E. coli*, несущие плазмиду рСК, утрачивают устойчивость к тетрациклину. Восстановление устойчивости к тетрациклину достигается при встраивании по *EcoRI*-сайту промоторсодержащих фрагментов, транскрипция с которых ориентирована в направлении гена *tet*. Плазмидный вектор рСК был успешно использован для клонирования фрагментов, содержащих промотор P_{lacUV5} лактозного оперона *E. coli* и промотор A_2 ДНК фага Т7 [10].

Клонирование гена 1.0 первоначально планировалось осуществить с использованием «минорного» промотора С для РНК-полимеразы *E. coli*, расположенного в геноме фага Т7 непосредственно перед геном 1.0 [11]. Мы предполагали, что в ходе транскрипции с промотора С вместе с геном 1.0 будет транскрибироваться ген *tet*, что приведет к восстановлению тетрациклиновой устойчивости клеток, несущих такие плазмиды. Для этого необходимо было выделить участок Т7-ДНК, в состав которого входили бы промотор С и ген 1.0.

Большая протяженность гена 1.0 и отсутствие подходящих рестриктазных сайтов в этом районе Т7-ДНК делали невозможным получение исход-

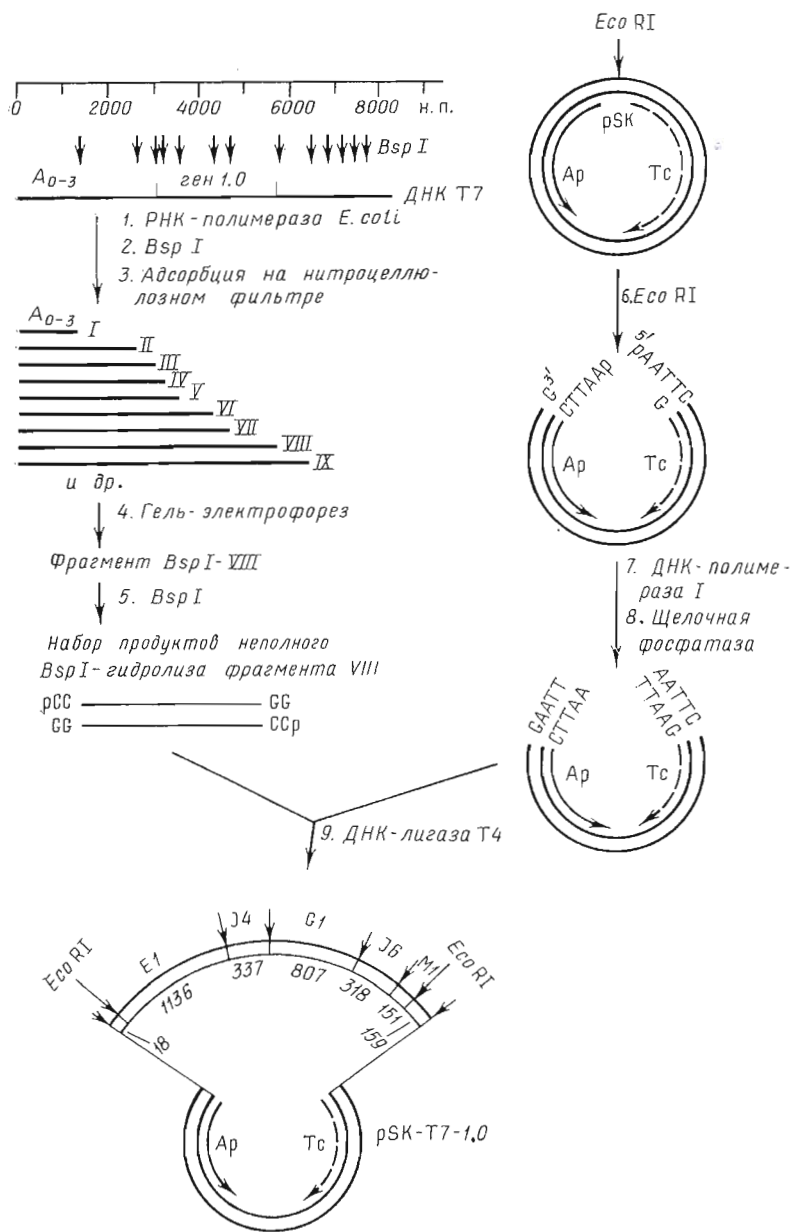


Рис. 2. Схема конструирования плазмид рСК-T7-1.0. Конструирование плазмидной ДНК осуществляли *in vitro*. 1-3 - выделение промоторсодержащих фрагментов I-IX из неполного *BspI*-гидролизата ДНК T7 в комплексе с РНК-полимеразой *E. coli* на нитроцеллюлозном фильтре согласно методу [12, 13]; 4 - разделение фрагментов *BspI*-(I-IX) электрофорезом в блоке агарозного геля; 5 - неполный гидролиз рестриктазой *BspI* фрагмента VIII; 6 - расщепление ДНК рСК эндонуклеазой *EcoRI*; 7 - достройка «липких» концов ДНК ДНК-полимеразой I *E. coli* в присутствии dGTP, dATP, TTP; 8 - дефосфорилирование ДНК рСК щелочной фосфатазой; 9 - лигазная сшивка ДНК рСК с продуктами неполного *BspI*-гидролиза фрагмента VIII. Трансформацию и отбор клонов проводили как описано в «Экспер. части». Номенклатуру *BspI*-фрагментов T7-ДНК см. в работе [14]

ного материала для клонирования путем полного гидролиза T7-ДНК доступными нам рестриктазами. Поэтому исходный материал мы получили с помощью метода (рис. 2), который был применен нами ранее для картирования *BspI*-сайтов [12, 13]. Согласно методу, к T7-ДНК добавляют РНК-полимеразу *E. coli*, а затем нуклеазу *BspI* и проводят гидролиз так, чтобы

на геном T7 приходилось в среднем около одного рестрикционного разрыва. Полученный гидролизат пропускают через нитроцеллюлозный фильтр. На фильтре удерживаются только те фрагменты ДНК, которые содержат промоторы A₀—A₃, расположенные вблизи левого конца T7-ДНК, поскольку именно с этими промоторами связывается ДНК-полимераза. Таким образом получается «лестница» продуктов неполного *BspI*-гидролиза T7-ДНК, изображенная на рис. 2.

Эти фрагменты далее разделяли гель-электрофорезом в агарозе и выделяли фрагмент *BspI*-VIII, в состав которого входят промотор С и ген 1.0. Фрагмент *BspI*-VIII вновь подвергали частичному гидролизу рестриктазой *BspI* и гидролизат непосредственно вводили в реакцию лигазной сшивки с ДНК плазмиды рSK, подготовленной как показано на рис. 2. Подготовка заключалась в том, что ДНК плазмиды рSK гидролизовали рестриктазой *EcoRI* и образовавшиеся липкие концы достраивали ДНК-полимеразой I *E. coli* в присутствии dGTP, dATP и dTTP, а для уменьшения фона вектора при трансформации проводили также обработку щелочной фосфатазой *E. coli*. Белки удаляли фенольной экстракцией, а вектор использовали в реакции лигазной сшивки. Полученной после лигирования смесью трансформировали клетки *E. coli* K12 HB101. Трансформанты высевали на чашки со средой, содержащей ампициллин (40 мкг/мл). Эффективность трансформации составляла ~10⁴ колоний на 1 мкг ДНК вектора.

Селекцию клонов мы попытались осуществить, исходя из изложенного выше плана, по восстановлению устойчивости к тетрациклину (10 мкг/мл). Однако все полученные клоны обладали фенотипом Ap^r, Tc^s, т. е. оставались чувствительными к тетрациклину. Таким образом, использовать активность промотора С для клонирования гена 1.0 нам не удалось. Поэтому отбор содержащих ген 1.0 клонов мы проводили методом гибридизации *in situ* по [15]. Отпечаток с чашки на нитроцеллюлозном фильтре обрабатывали для денатурации и иммобилизации ДНК плазмид как описано в работе [15], а затем проводили гибридизацию с *BspI*-фрагментами T7-ДНК, картированными в гене 1.0. Эти фрагменты метили ³²P методом ник-трансляции. Отбор проводили в два этапа. Первоначально были отобраны клоны, ДНК плазмид которых гибридизовалась с ³²P-меченым фрагментом *BspI*-M1, картированным вблизи левого конца гена 1.0, а затем среди этих клонов были отобраны клоны, несущие рекомбинантные плазмидные ДНК, которые гибридизовались с ³²P-меченым фрагментом *BspI*-J4, картированным в середине гена 1.0 [14] (см. рис. 2). В результате было отобрано два клона. ДНК плазмид этих клонов (далее плазмиды рSK-T7-1.0a и рSK-T7-1.0b) содержали вставки, отделяющиеся от векторной ДНК при гидролизе эндонуклеазой *EcoRI*. Вставки имели одинаковую длину порядка 3000 н.п. Для доказательства того, что вставки содержат весь ген 1.0, мы поместили их методом ник-трансляции и гибридизовали *in situ* с отпечатком гель-электрофореграммы *BspI*-гидролизата T7-ДНК на нитроцеллюлозном фильтре. Оказалось, что вставки ДНК рSK-T7-1.0 гибридизуются только с фрагментами *BspI*-M1, -J6, -G1, -J4, -E1, принадлежащими гену 1.0 и полностью покрывающими его (картирование и номенклатуру *BspI*-фрагментов T7-ДНК см. [14], рис. 3).

Ориентация гена 1.0 в плаزمидях рSK-T7-1.0, указанная на рис. 2, была установлена по данным рестрикционного анализа (рис. 4). При гидролизе ДНК рSK-T7-1.0 эндонуклеазой *BspI* появляются фрагменты *BspI*-E1, -G1, -J6, -J4 (не принадлежащие векторной ДНК) и фрагмент длиной ~320 н.п. Последний при гидролизе *EcoRI* расщепляется с образованием фрагмента длиной ~160 н.п. (очевидно, фрагмент M1) и фрагмента *BspI*+*EcoRI*-гидролизата ДНК рSK длиной 159 н.п. (см. рис. 2). Анализ нуклеотидных последовательностей концевых фрагментов *BspI*-гидролизата ³²P-меченых *EcoRI*-вставок ДНК рSK-T7-1.0a и рSK-T7-1.0b подтвердил, что концевыми *BspI*-фрагментами во вставках являются фрагменты M1 и E1 ДНК T7. Таким образом, ген 1.0 ориентирован в плазмидях в направлении, противоположном направлению гена *tet*.

Интересно было выяснить, происходит ли накопление РНК-полимеразы T7 в клетках, обладающих рекомбинантными плазмидами, поскольку из-

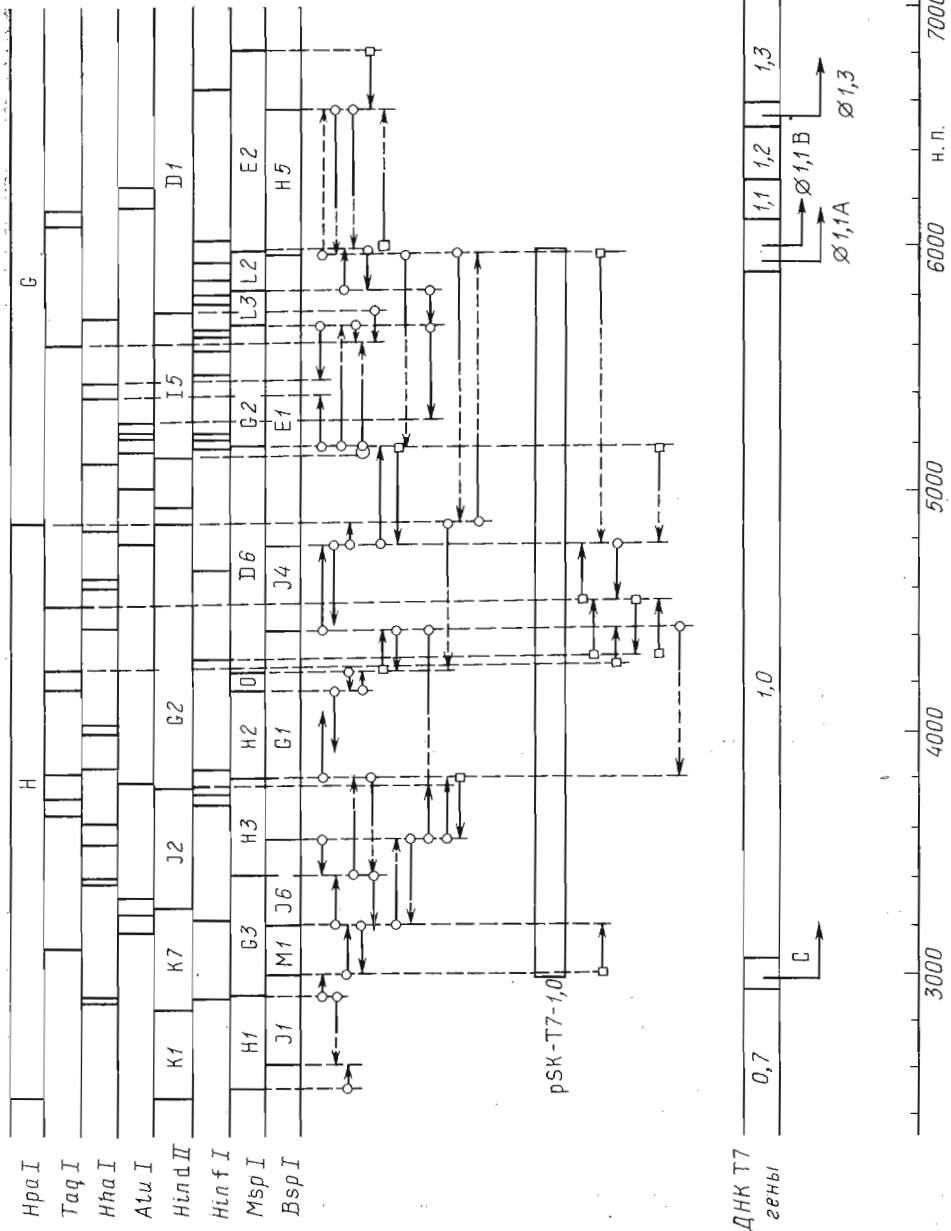


Рис. 3. Схема установления нуклеотидной последовательности и карта расщепления эндонуклеазами рестрикции участка в районе гена 1.0 ДНК Т7 и *EcoRI*-вставки ДНК рСК-Т7-1.0а. Фрагменты, получающиеся при действии рестриктаз, изображены прямыми линиями. Стрелки указывают направление от концевой метки, а сплошная часть стрелок обозначает установленную последовательность данной цепи. Кружок и квадратик — радиоактивный 5'- или 3'-концевой фосфатный остаток соответственно. С — промотор РНК-полимеразы *E. coli*, $\varnothing 1.1A$, $\varnothing 1.1B$ и $\varnothing 1.3$ — промоторы РНК-полимеразы Т7

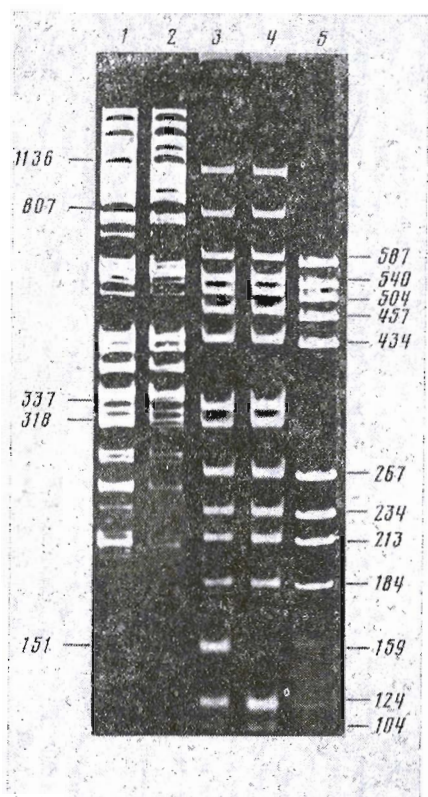


Рис. 4. Результаты гель-электрофореза продуктов гидролиза ДНК Т7 и ДНК плазмид рСК и рСК-Т7-1.0а: 1 и 2 — гидролизат ДНК Т7, полученный действием эндонуклеазы *BspI*; 3 — гидролизат ДНК плазмиды рСК-Т7-1.0а, полученный действием эндонуклеаз *BspI* и *EcoRI*; 4 — *BspI*-гидролизат ДНК рСК-Т7-1.0а; 5 — продукты гидролиза ДНК плазмиды рСК, полученные действием *BspI* и *EcoRI*. Слева указаны длины *BspI*-фрагментов ДНК Т7, справа — фрагменты *BspI*-гидролизата ДНК рСК, согласно [7, 10]. Электрофорез проводили 6 ч в блоке 20×20×0,5 см 4% ПААГ в буфере ТАЕ при 100 В

вестно, что транскрипция гена устойчивости к ампициллину может осуществляться и со стороны гена *tet* [16, 17]. С этой целью мы проверяли активность РНК-полимеразы в грубых лизатах клеток в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М рифампицина. Антибиотик в этой концентрации полностью блокирует активность РНК-полимеразы *E. coli*, но не влияет на активность РНК-полимеразы Т7 [18, 19], что позволяет различать активности обоих ферментов в неочищенных экстрактах клеток. Результаты измерений сведены в табл. 1. В клетках *E. coli* HB101 (рСК-Т7-1.0а) наблюдается активность РНК-полимеразы, устойчивой к рифампицину. Эта активность сопоставима с активностью РНК-полимеразы Т7 в клетках *E. coli* В, инфицированных бактериофагом Т7. Плазмида рСК-Т7-1.0b не индуцирует рифампицинустойчивую РНК-полимеразу.

ДНК плазмиды рСК-Т7-1.0а использовалась нами для уточнения нуклеотидной последовательности гена 1.0. Для этого из состава ДНК плазмиды после гидролиза эндонуклеазой *EcoRI* и последующего разделения фрагментов электрофорезом в ПААГ выделяли ДНК-вставку, которую гидролизовали одной из эндонуклеаз *MspI*, *TaqI*, *HinfI*, *BspI* (см. рис. 3). В образовавшиеся фрагменты вводили ^{32}P -метку, как описано в «Экспериментальной части», и фрагменты подвергали повторному гидролизу эндонуклеазами рестрикции. ^{32}P -Меченые субфрагменты разделяли гель-электрофорезом. Структуру определяли модифицированным методом Максама — Гилберта [20—23]. Схема установления первичной структуры по данным анализа фрагментов из *EcoRI*-вставки ДНК плазмиды рСК-Т7-1.0а и фрагментов ДНК Т7 представлена на рис. 3. В этой структуре идентифицированы все сайты рестрикции, полностью согласующиеся с опубликованными данными картирования [14], а также участок действия РНКазы III, промотор С для РНК-полимеразы *E. coli* и промотор ϕ 1.1А для РНК-полимеразы Т7.

При определении структуры гена в ряде случаев мы наблюдали явления «компрессии» разных типов: нерегулярное изменение расстояний между полосами на радиоавтографах гелей, сдвигание соседних полос, инвер-

Активность рифампицинустойчивой РНК-полимеразы в лизатах клеток плазмидных штаммов *E. coli* λ

Клетки	Активность *, имп/мин
<i>E. coli</i> HB 101 (pBR322)	560 (± 20)
<i>E. coli</i> HB 101 (pSK-T7-1.0a)	53 700 (± 15)
<i>E. coli</i> HB 101 (pSK-T7-1.0b)	480 (± 20)
<i>E. coli</i> B, инфицированные фагом T7	80 490 (± 10)

* Активность определяли по включению [14 C]AMP в кислотонерастворимый продукт. Приведены усредненные данные трех-четырёх определений с экстрактами независимо выращенных клеток; в скобках указаны отклонения, в процентах.

Таблица 2

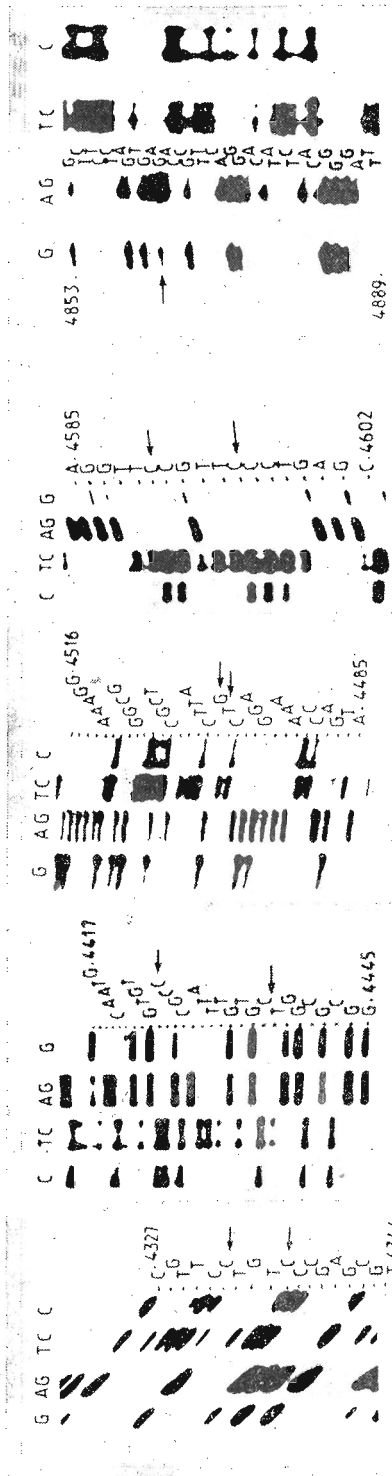
Различия в структурах гена 1.0 ДНК T7, определенных в настоящей работе и в работе [9]

Участок различия, номера нуклеотидов *	Данные работы [9]	Данные настоящей работы
4326-4341	CGCAAGACAAGGCTC	CGCAAGGACAGGGCTC
4437-4449	CGCGGTTTCGTGTTT	CGCGGTCGTGTTT
4447-4457	TTTACGCTGTG	TTTACGCCGTG
4494-4503	GGACGTCTTA	GGACTGCTTA
4586-4599	GGTTCGTTTCCTG	GGTCCGTTCCCTG
4860-4869	AGTGAAACCG	AGTGAGACCG
4911-4921	ATTCTGCAAGC	ATTCTACAAGC
5031-5041	CTGGCTTACGG	CTGGCTCACGG
5159-5169	GGGTCTGATGT	GGGTCCGATGT
5217-5227	GAATCCGTGAG	GAATCTGTGAG

* По работе [7].

сию подвижности фрагментов. Преодолеть «компрессию» иногда удавалось за счет более жестких условий электрофореза или путем анализа структуры комплементарной цепи. Например, сдвигание соседних полос при фракционировании продуктов неполной химической деградации, полученных по модифицированному методу Максама — Гилберта, наблюдалось в районе 3747-го нуклеотидного остатка при анализе цепи фрагмента *BspI*-J6. Анализ цепи, комплементарной этому участку, показал, что в положении 3747 находится остаток аденозина, а не гуанозина. При секвенировании фрагмента длиной 146 н.п. (фрагмент *MspI* (4261) — *BspI* (4407), см. рис. 1) из состава ДНК T7 мы столкнулись с компрессионной инверсией подвижности фрагмента, заканчивающегося на остаток цитидина-4309. Остаток гуанозина-4308 не выявлялся по этой причине в трех независимых экспериментах при секвенировании фрагмента, расположенного между нуклеотидными остатками 4261—4407. Только секвенирование более коротких фрагментов из состава ДНК pSK-T7-1.0 и из ДНК T7 (фрагмент 4271—4579, полученный из *TaqI*-гидролизата *EcoRI*-вставки плазмиды pSK-T7-1.0a, или фрагмент 4278—4586, полученный из *HinfI*-гидролизата *EcoRI*-вставок ДНК плазмиды pSK-T7-1.0, или этот же фрагмент из ДНК T7) по обоим комплементарным цепям выявило, что в положении 4308 действительно находится остаток гуанозина.

В результате перепроверки данных структурного анализа фрагментов, принадлежащих гену 1.0, выяснилось, что уточненная нами структура отличается от структуры, определенной в работе [9], в 13 местах (см. табл. 2). Радиоавтографы соответствующих участков структурных гелей показаны на рис. 5. Часть этих различий — точечные замены оснований —



не приводит к изменению аминокислотной последовательности. Наиболее существенные различия следующие. В структуре [9] между G (4331) и A (4332) отсутствует имеющийся, по нашим данным, остаток гуанозина. В структуре, определенной Шталем и Зинном, имеется остаток T (4443), отсутствующий по нашим данным. Следствием этих различий является изменение структуры белка на участке в 37 аминокислотных остатков. Остальные различия нуклеотидной последовательности либо не приводят к замене аминокислот, либо дают лишь точечные замены. Еще раз отметим, что в табл. 2 показаны только те участки, на которых мы считаем правильной нашу структуру. Те участки, на которых, по уточненным данным, оказалась верной структура [9], перечислены выше.

Различия в структурах гена 1.0, определенных нами и в работе [9], могут быть объяснены тем, что исследовались различные объекты. В работе Шталя и Зинна [9] исследована структура клонированного фрагмента, включающего в себя ген 1.0. Этот фрагмент получен из ДНК делеционных мутантов фага T7: H3 и LG3. В процессе подготовки гетеродуплексного участка для клонирования использовалась нуклеаза S₁, действие которой могло вызвать изменения структуры. В работе [9] ничего не говорится об экспрессии гена 1.0 в бактериальных клетках, несущих рекомбинантные плазмиды, — неизвестно, продуцирует ли этот плазмидный штамм активную РНК-полимеразу T7.

В нашей работе исследовались два объекта: ДНК фага T7 дикого типа и ДНК плазмиды pSK-T7-1.0a, индуцирующая синтез активной РНК-полимеразы T7. В другом плазмидном штамме *E. coli* HB101 (pSK-T7-1.0b) такая активность отсутствовала. Рестрикционный анализ ДНК плазмид не выявил различий между вставками pSK-T7-1.0a и pSK-T7-1.0b. Однако анализ последовательности нуклеотидов ДНК плазмиды pSK-T7-1.0b на участке гена 1.0 4278—4586 н.п. обнаружил, что тимидин-4316 в ней делегирован (рис. 6). Возможно, именно эта делеция приводит к тому, что ген 1.0 становится неактивным в составе рекомбинантной плазмиды. Очевидно, что с возможностью изменений структуры генов в результате клонирования нельзя не считаться.

Аминокислотная последовательность, вытекающая из нуклеотидной последовательности, показана на рис. 1. Из двух комплементарных цепей ДНК значащей является L-цепь. Анализ рамки трансляции проводился с помощью машинной обработки. При этом оказалось, что только в одной из трех возможных рамок трансляции в L-цепи ДНК не встречается терминирующих кодонов на участке от 3171-го до 5819-го нуклеотидного остатка. В двух других рамках трансляции и во всех рамках трансляции R-цепи ДНК аминокислотная последовательность обрывается на коротких участках кодонами терминации трансляции. Нуклеотидная последовательность L-цепи от кодона ATG (3171—3173), кодирующего N-концевой метионин, транскрибируется в аминокислотную последовательность, представленную на рис. 1, и заканчивается терминатором TAA, находя-

Рис. 5. Участки радиоавтографов, полученных со структурных гелей, на которых фракционировались продукты химических деградаций фрагментов; а — *MspI* (4260) — *BspI* (4407); б — L-цепи фрагмента *BspI*-J4 (4408—4744); в — L-цепи фрагмента *BspI*-J4 (4408—4744); г — фрагмента *BspI* (4408) — *HinfI* (4686), полученного из ДНК pSK-T7-1.0a; д — фрагмента *BspI* (4745) — *MspI* (5152); е — фрагмента *HpaI* (4848) — *MspI* (5152); ж — фрагмента *BspI* (4745) — *MspI* (5152); з — фрагмента *BspI* (4745) — *MspI* (5152); и, к — фрагмента *MspI* (5153) — *HhaI* (5340). Буквы над колонками указывают специфичность реакций химической модификации, в которых получен данный набор фрагментов. Вертикальный ряд букв показывает, как «читается» нуклеотидная последовательность с этого участка радиоавтографа. Цифрами слева или справа от радиоавтографа указана нумерация данного остатка основания в нуклеотидной последовательности гена 1.0 ДНК T7, представленной на рис. 1. Стрелками указаны различия в последовательности нуклеотидов, представленной на рис. 1, от последовательности нуклеотидов, определенной в работе [9]

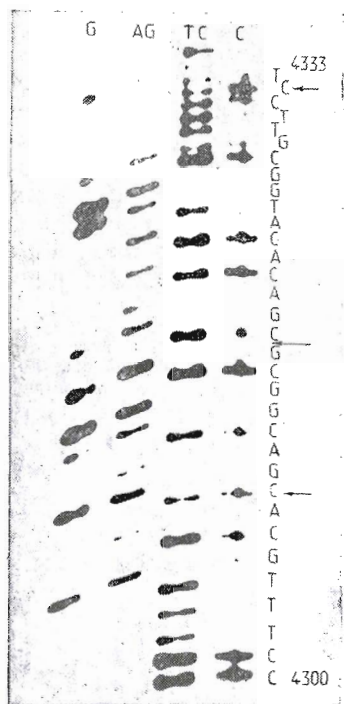


Рис. 6. Участок радиоавтографа, полученного со структурного геля, на котором фракционировались продукты химической деградации фрагмента *TaqI* (4274) — *BspI* (4407) ДНК рСК — Т7-1.0b модифицированным методом Максама — Гилберта

щимся в положениях 5820—5822. Правильность определения концевых последовательностей белка, по данным структуры ДНК, подтверждается результатами прямого исследования N- и C-концевых аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы Т7 [11, 24]. Иницирующему кодону АТГ (3171—3173) РНК-полимеразы Т7 предшествует тетра nukлеотид GAGG (3161—3164), комплементарный последовательности 3'-конца 16S рРНК [25].

Как оказалось, полипептидная цепь РНК-полимеразы Т7 состоит из 883 аминокислотных остатков, суммирование молекулярных масс которых дает значение молекулярной массы белка, равное $9,81 \cdot 10^4$, что соответствует в пределах ошибки определения данным прямого определения молекулярной массы белка методом гель-электрофореза и гель-фильтрации [5, 26]. В табл. 3 сопоставлен аминокислотный состав РНК-полимеразы фага Т7, найденный из нуклеотидной последовательности гена 1.0, с данными прямого анализа белка [26]. Видно, что соответствие найденных двумя методами составов РНК-полимеразы Т7 неплохое. РНК-полимераза Т7 является слабокислым белком: на 110 остатков дикарбоновых аминокислот приходится 107 остатков основных аминокислот. В полипептидной цепи РНК-полимеразы Т7 наиболее часто встречаются остатки аланина, лизина, лейцина и глутаминовой кислоты. Как и в случае β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*, в структуре РНК-

полимеразы Т7 можно выделить кластеры основных аминокислотных остатков (например, аминокислотная последовательность, кодируемая L-цепью ДНК на участке от 4325-го до 4355-го основания). Эти кластеры — возможные претенденты на роль участков фермента, осуществляющих взаимодействие с ДНК или РНК.

Обработка данных прямого сравнительного анализа аминокислотных последовательностей субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* и РНК-полимеразы Т7 не выявляет гомологий на участках длиной более пяти аминокислотных остатков. Частота встречаемости таких участков гомологии не превышает случайной. Таким образом, из сопоставления первичных структур бактериального и фагового фермента вытекает, что эти белки имеют независимое эволюционное происхождение.

Следует особо обсудить еще один результат настоящего исследования — получение плазмидного штамма, продуцирующего РНК-полимеразу Т7. Известно, что выделение РНК-полимеразы Т7 из клеток *E. coli* В, зараженных фагом Т7, довольно сложно. Для получения биомассы *E. coli* В, инфицированных фагом Т7 и пригодных для выделения РНК-полимеразы Т7, необходима предварительная наработка фага; при инфекции клеток возникает проблема синхронизации процесса, которая достигается большой множественностью заражения, и, наконец, проблема остановки роста зараженных клеток в определенный момент (от 8 до 12 мин) после заражения, так как содержание РНК-полимеразы Т7 после инфекции проходит через максимум [7]. Эти проблемы, по-видимому, не должны возникать при использовании плазмидного штамма-продуцента, *E. coli* НВ101 (рСК-Т7-1.0a). На его основе, по-видимому, возможно конструирование еще более эффективных продуцентов РНК-полимеразы Т7, а также создание штаммов *E. coli*, продуцирующих мутанты по РНК-полимеразе Т7,

Аминокислотный состав РНК-полимеразы Т7

Аминокислота	Данные настоящей работы		Данные работы [26]
	число остатков	10 ² моль/моль белка	10 ² моль/моль белка
Asp	43	4,9	} 10,9
Asn	40	4,5	
Thr	44	5,0	
Ser	41	4,6	
Gln	33	3,7	
Glu	67	7,6	12,8
Pro	38	4,3	3,6
Gly	54	6,1	8,4
Ala	100	11,3	11,8
¹ / ₂ Cys	12	1,4	2,3
Val	58	6,6	6,3
Met	26	3,0	2,3
Ile	52	5,6	4,7
Leu	66	7,5	7,1
Tyr	23	2,6	1,8
Phe	37	4,2	3,4
His	23	2,6	2,2
Lys	65	7,4	7,0
Arg	42	4,8	4,9
Trp	19	2,2	1,2

с целью выявления участков гена 1.0, ответственных за кодирование активных центров фермента. Плазмида рSK-T7-1.0a вместе с плазмидой рBR 322-рТ7, созданной нами в качестве источника промотора класса III для РНК-полимеразы Т7 [27], делает возможным создание вектора для клонирования и экспрессии различных генов на основе активности РНК-полимеразы и ее промотора.

Экспериментальная часть

В работе использованы гидразингидрат, диметилсульфат, пиперидин, формамид (Merck, ФРГ); ампициллин, тетрациклин, хлорамфеникол, агароза, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид (Sigma, США). Выделение промоторных фрагментов и гибридизацию нуклеиновых кислот осуществляли с помощью фильтров BA-85 (Schleicher und Schüll, ФРГ). Использовались также трис (Merck, ФРГ) (для электрофореза применяли трис Олайнского завода химреактивов), [¹⁴C] АТФ (550 мКи/ммоль, Amersham, Англия), [³²P]dNTP (3000 Ки/ммоль), [³²P]АТФ (3000 Ки/ммоль) фирмы «Изотоп» (СССР), dNTP (Sigma, США). Щелочная фосфатаза, тРНК, ДНК-лигаза фага Т4, эндонуклеазы рестрикции *AbaI*, *EcoRI*, *BspI* — препараты производства СКТБ БАВ (Новосибирск); полинуклеотидкиназа фага Т4 любезно предоставлена М. И. Ривкиным (ИЦиГ СО АН СССР), ДНК-полимераза I *E. coli* и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) — В. В. Потаповым (ИЦиГ СО АН СССР), *HpaI*, *HinfI* — П. М. Чумаковым (ИМБ АН СССР), *HindII*, *HhaI* — В. Г. Коробко (ИБХ АН СССР). *BsuRI* выделяли методом [28], *TaqI* — методом [29]. Препараты РНК-полимеразы *E. coli* производства СКТБ БАВ дополнительно очищали по методу [30]. Фаг Т7⁺ (предоставлен Ф. У. Штудиером, США) выделяли по методу [31], ДНК фага Т7 получали из фага фенольной экстракцией согласно работе [32]. ДНК плазмид рBR 322, рSK, рSK-T7-1.0 выделяли из клеток *E. coli* HB101, выращенных на LB-среде (10 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl на 1 л среды); выделение проводили согласно [33, 34]. Биомассу *E. coli* В, инфицированную фагом Т7, получали по [26]; при достижении мутности культуры $A_{550}=3,5-4$ клетки заражали фагом Т7 с множест-

вешностью 10. После 10 мин инкубации рост клеток останавливали добавлением хлорамфеникола до концентрации 50 мг/л и охлаждением культуры до 4° С, клетки собирали центрифугированием.

Разделение фрагментов ДНК. Фрагменты ДНК Т7 или рSK-T7-1.0 разделяли электрофорезом в пластинах полиакриламидного и агарозного геля. Концентрацию и размеры геля выбирали в зависимости от молекулярной массы разделяемых фрагментов. Для разделения фрагментов длиной от 50 до 2000 н.п. использовали 4% ПААГ с размером 20×40×0,1 см. Обычно использовали буфер TBE (50 мМ трис-борат, 2 мМ EDTA, pH 8,3) или TAE (50 мМ трис, 20 мМ ацетат натрия, 2 мМ EDTA, pH 8,05) и соотношение акриламид/метиленабисакриламид=30/1. Для препаративных наработок фрагментов из полных гидролизатов ДНК Т7 и рSK-T7-1.0, полученных действием рестриктаз *BspI*, *MspI*, *HindII*, применяли 4% ПААГ размером 30×80×0,3 см. Разделение фрагментов из *HpaI*-гидролизата ДНК Т7 и *EcoRI*-гидролизата ДНК рSK-T7-1.0 проводили электрофорезом в пластинах 0,7% агарозы (20×30×1 см) в буфере TAE.

После окончания электрофореза фрагменты ДНК выявляли окрашиванием в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) в течение 10–20 мин и фотографировали в УФ-свете на пленку «Микрат-300» («Тасма») через светочувствительный фильтр ОС-14.

Для разделения продуктов неполной химической деградации фрагментов ДНК при определении нуклеотидных последовательностей применяли электрофорез в ПААГ с 7 М мочевиной в буфере TBE в пластинах размером от 20×40×0,05 до 30×100×0,05 см в условиях, описанных в работе [20].

Радиоактивно меченные фрагменты ДНК выявляли радиоавтографией на рентгеновской пленке РМ-1 «Свема» с использованием усиливающих экранов ЭУ-ВЗ У4.2. Радиоавтограф использовали в качестве шаблона для вырезания полос геля, в которых были локализованы радиоактивно меченные фрагменты ДНК.

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции *BspI*, *HpaI*, *HhaI*, *MspI* проводили в буфере В1 (25 мМ трис-НСl, pH 7,9, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол) при 37° С в течение 1 ч, добавляя 1 ед. акт. фермента на 1 мкг ДНК. Расщепление эндонуклеазой *TaqI* проводили аналогично, но при 65° С. Расщепление *HindII* и *HinfI* осуществляли в буфере В1, но в отсутствие NaCl, а эндонуклеазой *EcoRI* — в буфере В1, но концентрация NaCl была 100 мМ. Концентрация ДНК в реакционных смесях составляла 0,1 мг/мл. Полноту гидролиза ДНК проверяли электрофорезом фрагментов в пластинах 4% ПААГ.

Дефосфорилирование фрагментов ДНК осуществляли щелочной фосфатазой *E. coli* (0,05 ед. акт. на 1 мл смеси) в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl (pH 8,8) и 10 мМ MgCl₂, в течение 1 ч при 37° С. Концентрация концевых фосфатов фрагментов в реакционной смеси составляла 1–3 мкМ. Фермент удаляли из смеси двукратной экстракцией фенолом, насыщенным буфером ТЕ (10 мМ трис-НСl, pH 7,9, 1 мМ EDTA). Фрагменты ДНК осаждали 75% этанолом из 1 М NaCl. В некоторых экспериментах после депротенинизации фенол удаляли экстракцией эфиром, а водную фракцию подвергали гель-фильтрации на колонке (2 мл) с сефадексом G-50 в буфере ТЕ.

Введение ³²P-метки в 5'-концы фрагментов ДНК. Фосфорилирование фрагментов ДНК проводили с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4. Для этого фрагмент (10 пмоль) в 10 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (pH 9,5), 1 мМ спермидин, нагревали 2 мин при 90° С, быстро охлаждали до 0° С и добавляли трис-НСl (pH 9,5) до концентрации 50 мМ, MgCl₂ до концентрации 10 мМ, β-меркаптоэтанол до концентрации 10 мМ, [γ-³²P]АТР до концентрации 10 мкМ, 1–2 ед. акт. полинуклеотидкиназы. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 37° С. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 10 мМ и меченые фрагменты отделяли от АТР пересаживанием этанолом или гель-фильтрацией на колонке (2 мл) с сефадексом G-50 в буфере ТЕ.

Введение ^{32}P -метки в 3'-концы фрагментов ДНК. Реакционную смесь, содержащую dNTP, 5–10 пмоль фрагмента ДНК, 5 ед. акт. ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова [35]) в буфере Р (20 мМ трис-НСI, рН 7,6, 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ β -меркаптоэтанол), инкубировали 20 мин при 37° С. Концентрация dNTP в реакционной смеси составляла 0,1 мМ, концентрация ^{32}P -меченого dNTP – 10 мкМ. При достройке фрагментов ДНК из *MspI*- и *TaqI*-гидролизатов использовали dGTP и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, для достройки фрагментов из *EcoRI*- и *HinfI*-гидролизатов – dGTP, dTTP и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 10 мМ, NaCl до 1 М; фрагменты ДНК осаждали этанолом.

Введение статистической ^{32}P -метки во фрагменты ДНК. «Ник-трансляцию» фрагментов ДНК осуществляли ДНК-полимеразой I *E. coli* в смеси, содержащей буфер Р, 2 пмоль фрагмента ДНК, 2 ед. акт. фермента, 0,02 мМ dGTP, dATP, dTTP и 1 мкМ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Реакцию проводили 1 ч при 37° С, фрагменты ДНК осаждали спиртом.

Конструирование рекомбинантных плазмид. а. Выделение фрагментов ДНК T7 для встраивания в плазмиды. Из неполного *BspI*-гидролизата ДНК T7 фрагмент *BspI*-VIII (рис. 2) выделяли фильтрованием фрагментов в комплексе с РНК-полимеразой *E. coli* через нитроцеллюлозные фильтры, как описано в работе [13]. После элюции фрагментов с фильтров проводили электрофорез в 0,7% агарозе. Фрагмент *BspI*-VIII электроэлюировали из геля по методике [36] и подвергали повторному неполному гидролизу эндонуклеазой *BspI*. Для этого 5 мкг фрагмента *BspI*-VIII в 50 мкл буфера В1 гидролизовали 0,5 ед. акт. *BspI* в течение 10 мин. Фермент инактивировали экстракцией 50 мкл фенола, насыщенного буфером ТЕ, и продукты гидролиза фрагмента *BspI*-VIII переосаждали дважды 75% этанолом из 1 М NaCl. Осадок растворяли в буфере Р.

б. Подготовка вектора. 2 мкг ДНК плазмиды pSK расщепляли эндонуклеазой *EcoRI*, образовавшиеся «лишние» концы достраивали ДНК-полимеразой I в присутствии dATP, dGTP и dTTP и после осаждения ДНК этанолом проводили дефосфорилирование. Белки удаляли экстракцией фенолом, а ДНК дважды переосаждали спиртом.

в. Лигазное сшивание. Линеаризованную ДНК pSK использовали в реакции лигазной сшивки с продуктами гидролиза эндонуклеазой *BspI* фрагмента *BspI*-VIII ДНК T7. С этой целью 2 мкг ДНК плазмиды, подготовленной как описано выше, и 5 мкг продуктов неполного расщепления фрагмента *BspI*-VIII растворяли в 30 мкл буфера Р, к смеси добавляли АТФ до концентрации 0,5 мМ и 0,5 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4. Реакцию проводили 12 ч при 4° С. Полученную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* K12 HB101.

Трансформация клеток E. coli и отбор клонов. а. Трансформация клеток. Культуру клеток *E. coli* K12 HB101 (*F⁻ pro⁻ leu⁻ thi⁻ gal⁻ lacY⁻ str⁻ r⁻ m⁻ EndoI⁻ recA⁻*) выращивали в 100 мл LB-среды до мутности A_{550} 0,6, бактериальные клетки осаждали центрифугированием и суспендировали в 50 мл 50 мМ CaCl_2 . Клетки выдерживали 6 ч при 0° С, центрифугировали и суспендировали в 2 мл 50 мМ CaCl_2 . К 200 мкл суспензии клеток добавляли 30 мкл продуктов лигирования, указанных выше. Клетки инкубировали 30 мин при 0° С и 2 мин при 42° С, добавляли 1 мл LB-среды. После 30 мин инкубации при 37° С клетки высевали на чашки с LB-агаром, содержащим 40 мкг/мл ампициллина. Трансформанты анализировали по чувствительности к тетрациклину, перекальвая на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин (40 мкг/мл) и тетрациклин (10 мкг/мл).

б. Анализ клонов гибридизацией с фрагментами ДНК T7. Клоны перекальвали на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин, покрытыми нитроцеллюлозными фильтрами BA-85. Клетки растили 12 ч, фильтры с колониями обрабатывали по методу [14]. Гибридизацию ДНК рекомбинантных плазмид, иммобилизованных на фильтрах, проводили с 10 мкг ^{32}P -меченых ник-трансляцией фрагментами ДНК T7 *BspI*-M1 и *BspI*-J4 (удельная активность фрагментов составляла 20 мкКи/мкг). Меченые фрагменты перед гибридизацией денатурировали прогреванием в тече-

ние 5 мин при 100°С в 75% диметилсульфоксиде. Среди проанализированных клонов было найдено 26 клонов, ДНК плазмид которых гибридизовалась с фрагментом *BspI*-M1, и 12 клонов, ДНК плазмид которых гибридизовалась с фрагментом *BspI*-J4. Среди этих клонов только у шести клонов ДНК плазмид гибридизовалась с обоими фрагментами.

в. *Анализ ДНК гибридных плазмид.* Биомассу для анализа ДНК плазмид выращивали из бактериальной колонии в течение 12 ч в 10 мл LB-среды, плазмидные ДНК выделяли по методике [33]. ДНК рекомбинантных плазмид рСК-Т7, гибридизующихся с фрагментами ДНК Т7, анализировали электрофорезом в 1% агарозе после гидролиза 1 мкг плазмидной ДНК эндонуклеазой *EcoRI*. Из данных рестрикционного анализа шести плазмидных ДНК рСК-Т7 только две содержали вставку длиной ~3000 н. п., отщепляемую из состава ДНК плазмиды рестриктазой *EcoRI*. В одной из плазмидных ДНК длина вставки составляла ~2000 н. п., в трех ДНК вставки не отщеплялись, по-видимому, вследствие потери *EcoRI*-сайта. Мы сосредоточили внимание на анализе ДНК плазмид, вставки которых отщеплялись *EcoRI* и соответствовали длине ~3000 н. п. Эти плазмиды (в дальнейшем плазмиды рСК-Т7-1.0а и рСК-Т7-1.0b) выделяли в препаративном масштабе из 1 л культуры клеток по методу [34]. 10 мкг ДНК плазмид рСК-Т7-1.0 гидролизовали эндонуклеазой *EcoRI*, образовавшиеся фрагменты разделяли электрофорезом в агарозном геле. Нижний фрагмент, соответствующий вставке, электроэлюировали из геля, осаждали и вводили ³²P-метку ник-трансляцией. ³²P-Меченый фрагмент-вставку использовали для гибридизации с фрагментами ДНК Т7 из *BspI*-гидролизата, иммобилизованными на нитроцеллюлозном фильтре BA-85, по методу [37].

г. *Рестрикционный анализ ДНК плазмид рСК-Т7-1.0.* ДНК плазмид рСК-Т7-1.0 (3 мкг) гидролизовали эндонуклеазой *BspI* или же *BspI* в присутствии *EcoRI* в условиях, описанных выше. После гидролиза фрагменты осаждали спиртом, растворяли в буфере TE и анализировали электрофорезом в ПААГ.

9. *Анализ активности РНК-полимеразы в грубых лизатах клеток E. coli.* Клетки *E. coli* HB101 (рBR322), *E. coli* HB101 (рСК-Т7-1.0) и *E. coli* В выращивали в 5 мл LB-среды до мутности A_{550} 3, клетки *E. coli* В заражали фагом Т7, как описано выше. Клетки осаждали центрифугированием и суспендировали в 0,3 мл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,9), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 50 мкМ рифампицин. К суспензии клеток добавляли лизоцим до концентрации 1 мг/мл и инкубировали 20 мин при 0°С. Клетки разрушали обработкой ультразвуком. Смесь центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин. Из супернатанта отбирали аликвоту 30 мкл и добавляли в реакционную смесь (270 мкл), содержащую указанный выше буфер, 0,1 мг/мл ДНК Т7, 0,4 мМ АТР, GTP, UTP и CTP (меченым использовали [¹⁴C]АТР с удельной активностью 79,5 мкКи/ммоль). Реакционную смесь инкубировали 20 мин при 37°С и реакцию останавливали добавлением 3 мл 5% трихлоруксусной кислоты, охлажденной до 0°С. Смесь выдерживали 10 мин при 0°С, фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры типа NUFS (45 мкм, Сунрог, ЧССР), осадок промывали 20 мл 5% трихлоруксусной кислоты. Фильтры высушивали и определяют радиоактивность в толуольном сцинтиляторе на счетчике Mark-III (Nuclear Chicago).

Химические реакции, использованные для специфической фрагментации ДНК при секвенировании. Перед проведением химических реакций образец ДНК, меченной ³²P по концевому звену, разделяли на четыре равные части по радиоактивности. Обычно в реакцию вводили (1–6) · 10⁵ имп/мин [³²P]ДНК и 15 мкг тРНК-носителя. Образцы [³²P]ДНК осаждали спиртом и высушивали в вакууме. Смеси после осаждения ДНК охлаждали жидким азотом, центрифугирование проводили в течение 3 мин на настольной центрифуге фирмы Eppendorf (модель 5414).

Для селективной модификации пиримидиновых звеньев (реакция ТС) и для модификации цитидиновых звеньев в присутствии NaCl (реакция С)

использовали гидролиз согласно методу [20] в модификации [22]. Модификацию ДНК по гуаниновым звеньям проводили метилированием диметилсульфатом в кислой среде по [21]. Время модификаций выбирали в зависимости от определяемой длины фрагментов ДНК. Для определения положения пуриновых звеньев ^{32}P -меченых фрагментов ДНК использовали частичную апуринизацию, предложенную в работах [22, 23]. Разрыв цепи ДНК по модифицированным звеньям осуществляли по [20].

Определение нуклеотидной последовательности гена 1.0 ДНК Т7.

а. Выделение фрагментов ДНК Т7. ДНК фага Т7 (50 0Е, 2,5 мг) после гидролиза одной из эндонуклеаз рестрикции *BspI*, *HindII* или *MspI* дефосфорилировали щелочной фосфатазой *E. coli*. Образовавшиеся фрагменты ДНК осаждали 75% спиртом из 1 М NaCl. Осадок растворяли в 0,5 мл буфера TE с 5% глицерином и 0,02% бромфеноловым синим. Фрагменты разделяли электрофорезом, как описано выше. В ходе работы были выделены следующие фрагменты ДНК Т7: из *BspI*-гидролизата — J1, J4, J6, M1, G1, E1 — 3, H5; из *MspI*-гидролизата — H1, H2, H3, G2 и G3, L1 — 3, E2, O, D4 — 8; из *HindII*-гидролизата — K7, J2, 14 — 5, S, M1 — 3, G1 — 5. Нумерация фрагментов соответствует нумерации, представленной на рис. 3 и в работе [14]. Из *HpaI*-гидролизата ДНК Т7 выделяли фрагменты H и G. 0,5 мг ДНК Т7 расщепляли эндонуклеазой *HpaI* в буфере В1 и в этой же реакционной смеси проводили дефосфорилирование образовавшихся фрагментов. Фракционирование продуктов гидролиза проводили в пластинах 0,7% агарозы.

б. Приготовление ^{32}P -меченых фрагментов ДНК Т7 для секвенирования. Фрагменты *BspI*-гидролизата ДНК Т7. Во фрагменты M1, J6, G1, J4, E1 и H5 вводили 5'- ^{32}P -концевую метку. В случае меченых фрагментов M1, J6, J4, H5 после денатурации разделяли комплементарные цепи по методу [38]. 5'- ^{32}P -Меченые фрагменты J6, G1, E1, E5 гидролизуют эндонуклеазой *MspI*, 5'- ^{32}P -фрагмент G1 — эндонуклеазой *HindII*, 5'- ^{32}P -фрагмент E1 — эндонуклеазой *HpaI* или *AluI*. Образовавшиеся субфрагменты разделяли электрофорезом в ПААГ.

Фрагменты G1, E1 и H5 расщепляли эндонуклеазой *MspI*, в 3'-концы образовавшихся субфрагментов вводили ^{32}P -метку и разделяли электрофорезом в ПААГ.

Фрагменты из *MspI*-гидролизата ДНК Т7. Во фрагменты H1, G3, H3, H2, O и G2 ^{32}P -метку вводили с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 и [γ - ^{32}P]АТР. В случае меченых фрагментов H3, H2 и O разделяли комплементарные цепи. 5'- ^{32}P -Меченые фрагменты H1 и G3 гидролизуют эндонуклеазой *BspI*, а меченый фрагмент G2 — одной из эндонуклеаз *HhaI*, *TaqI*, *AluI*. ^{32}P -Меченые субфрагменты фракционировали электрофорезом в ПААГ.

Во фрагмент E2 ^{32}P -метку вводили в 3'-концы с помощью ДНК-полимеразы I и [α - ^{32}P]dCTP, фрагмент расщепляли эндонуклеазой *BspI* и выделяли меченные по одному концу субфрагменты.

Фрагменты *HpaI*-гидролизата ДНК Т7. Во фрагменты H и G вводили 5'- ^{32}P -концевую метку, меченый фрагмент H расщепляли эндонуклеазой *MspI*, а фрагмент G — *BspI*.

Фрагмент G гидролизуют эндонуклеазой *MspI* и продукты гидролиза метили по 3'-концам ^{32}P . Меченные по одному концу фрагменты после фракционирования в ПААГ использовали для секвенирования.

Фрагменты из *HindII*-гидролизата ДНК Т7. Во фрагмент 15 вводили 5'- ^{32}P -метку. Меченый фрагмент расщепляли эндонуклеазой *TaqI*, образовавшиеся субфрагменты фракционировали в ПААГ.

Фрагменты из неполного *BspI*-гидролизата ДНК Т7. Для определения ориентации фрагментов M1, J6, J4, G1, H5 из *BspI*-гидролизата ДНК Т7 относительно генома были выделены фрагменты IV—IX из неполного *BspI*-гидролизата ДНК Т7 (см. рис. 2). Во фрагменты IV—IX вводили 5'- ^{32}P -концевую метку, подвергали полному гидролизу эндонуклеазой *BspI* и продукты разделяли в ПААГ. Фрагменты *BspI* — M1, J6, G1, J4 и H5, ^{32}P -меченые по одному концу, выделяли из геля и использовали для секвенирования.

Приготовление ^{32}P -меченых фрагментов ДНК плазмид рСК-Т7-1.0. 500 мкг ДНК плазмиды рСК-Т7-1.0а или рСК-Т7-1.0б, выделенных по методу [34], гидролизуют эндонуклеазой *EcoRI* и продукты гидролиза разделяли в агарозном геле. Фрагмент, содержащий вставку длиной 3000 н. п., выделяли из геля электрооэлюцией. Для определения нуклеотидной последовательности фрагменты из состава *EcoRI*-вставки плазмид готовили следующим образом:

а) *EcoRI*-фрагмент (10 пмоль) из состава ДНК рСК-Т7-1.0а или рСК-Т7-1.0б метили ^{32}P по 3'-концам и затем подвергали гидролизу эндонуклеазой *BspI*, после разделения в ПААГ ^{32}P -меченые фрагменты использовали для секвенирования, а внутренние фрагменты *BspI*-G1 и -J4 после электрооэлюции из геля метили по 5'-концам ^{32}P . 5'- ^{32}P -Меченый фрагмент G1 расщепляли эндонуклеазой *HindII*, а меченый фрагмент J4 — *TaqI*; образовавшиеся субфрагменты после фракционирования в ПААГ использовали для секвенирования;

б) *EcoRI*-фрагмент (5 пмоль) ДНК рСК-Т7-1.0а гидролизуют эндонуклеазой *MspI*, в 3'-концы образовавшихся фрагментов вводят ^{32}P -метку. После фракционирования в ПААГ выделяют фрагмент D6 и расщепляют эндонуклеазой *TaqI* или *BspI*. Меченые субфрагменты после разделения в ПААГ использовали для секвенирования;

в) *EcoRI*-фрагмент (10 пмоль) ДНК рСК-Т7-1.0а или из ДНК рСК-Т7-1.0б гидролизуют эндонуклеазой *TaqI*, в 3'-концы образовавшихся фрагментов вводят ^{32}P -метку. После фракционирования в ПААГ выделяют фрагмент длиной 309 н. п. (фрагмент, покрывающий участок 4271—4579 в последовательности гена 1.0, представленной на рис. 1) и подвергают гидролизу эндонуклеазой *BspI* или *HinfI*, образовавшиеся меченые субфрагменты после разделения в ПААГ использовали для секвенирования;

г) *EcoRI*-фрагмент (5 пмоль) ДНК рСК-Т7-1.0а гидролизуют эндонуклеазой *HinfI*, в 3'-концы образовавшихся фрагментов вводят ^{32}P -метку, меченые фрагменты разделяли в ПААГ. ^{32}P -Меченый фрагмент длиной 409 н. п. (*HinfI*-фрагмент, покрывающий участок 4218—4686 в последовательности гена 1.0, представленной на рис. 1) выделяли из геля и подвергали расщеплению эндонуклеазой *BspI* или *TaqI*. Меченые субфрагменты разделяли электрофорезом в ПААГ и использовали для секвенирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохлаев В. С., Шуваева Т. М. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 283—286.
2. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Соломатина И. С., Шуваева Т. М., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. Докл. АН СССР, 1981, т. 261, № 3, с. 763—768.
3. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Guriev S. O., Chertov O. Yu., Polovnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, № 3, p. 621—629.
4. Burton Z., Burgess R. R., Lin J., Moore D., Holder S., Gross C. A. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 12, p. 2889—2904.
5. Chamberlin M., McGrath J., Waskell L. Nature, 1970, v. 228, № 5268, p. 227—231.
6. Chamberlin M., Ring J. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 6, p. 2235—2244.
7. Dunn J. J., Studier F. W. J. Mol. Biol., 1983, v. 166, № 4, p. 477—535.
8. Grachev M. A., Pletnev A. G. FEBS Lett., 1981, v. 127, № 1, p. 53—56.
9. Stahl S. J., Zinn K. J. Mol. Biol., 1981, v. 148, № 4, p. 481—485.
10. Серпинский О. И., Каргина Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Онищенко А. И., Плетнев А. Г., Мигина Ю. Л. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 840—847.
11. McConnell D. J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 11, p. 3491—3503.
12. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. Докл. АН СССР, 1978, т. 239, № 2, с. 475—478.
13. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Плетнев А. Г. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 10, с. 1587—1590.
14. Studier F. W., Rosenberg A. H., Simon M. N., Dunn J. J. J. Mol. Biol., 1979, v. 135, № 4, p. 917—937.
15. Thayer R. E. Analyt. Biochem., 1979, v. 98, № 1, p. 60—63.
16. Stüber D., Bujard H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 167—171.

17. Brosius J., Cate R. L., Perlmutter A. P. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 15, p. 9205-9210.
18. Hinkle D. C., Mangel W. F., Chamberlin M. J. J. Mol. Biol., 1972, v. 70, № 2, p. 209-220.
19. Chamberlin M., Ring J. J. Mol. Biol., 1973, v. 248, № 6, p. 2245-2250.
20. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
21. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1281-1283.
22. Коробко В. Г., Грачев С. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420-1422.
23. Свердлов Е. Д., Левитан Т. Л. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 3, с. 370-375.
24. Osterman H. L., Coleman J. E. Biochemistry, 1981, v. 20, № 17, p. 4884-4892.
25. Shine J., Dalgarno L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 4, p. 1342-1346.
26. Niles E. G., Conlon S. W., Summers W. C. Biochemistry, 1974, v. 13, № 19, p. 3904-3916.
27. Иванова Е. М., Кутявин И. В., Плетнев А. Г., Шаманин В. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1501-1516.
28. Bron S., Murray K., Trautner T. A. Mol. Gen. Genet., 1975, v. 143, № 1, p. 13-23.
29. Salo S., Hutchison C. A., Harris J. I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 542-546.
30. Gonzalez N., Wiggs J., Chamberlin M. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1977, v. 182, № 2, p. 404-408.
31. Studier F. W. Virology, 1969, v. 39, № 3, p. 562-574.
32. Studier F. W. J. Mol. Biol., 1965, v. 11, № 2, p. 373-390.
33. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513-1523.
34. Guerry P., Le Blanc D. J., Falkow S. J. Bacteriol., 1973, v. 116, № 2, p. 1064-1066.
35. Klenow H., Overgaard-Hansen K., Palkar S. S. Eur. J. Biochem., 1971, v. 22, № 3, p. 371-381.
36. Allington W. B., Cordry A. L., McCullough G. A., Mitchell D. E., Nelson J. W. Analyt. Biochem., 1978, v. 85, № 1, p. 188-196.
37. Southern E. M. J. Mol. Biol., 1975, v. 98, № 3, p. 503-517.

Поступила в редакцию
18.X.1983

T7 PHAGE RNA POLYMERASE: CLONING AND SEQUENCING OF GENE

GRACHEV M. A., PLETNEV A. G.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Gene 1.0 of T7 phage coding for a phage-specific RNA polymerase has been cloned in a plasmid vector. One of the clones obtained, viz. *E. coli* K12 HB101(pSK-T7-1.0a), produced an active T7 RNA polymerase as revealed by the fact that its extract stimulated RNA synthesis on the T7 DNA template in the presence of rifampicin. Analysis of gene 1.0 fragments isolated from pSK-T7-1.0a plasmid made it possible to refine the sequence of this gene which has been recently published by the authors of the present paper and, independently, by other workers. Another plasmid, pSK-T7-1.0b, did not differ from pSK-T7-1.0a in the restriction map. However, it failed to induce production of a rifampicin-insensitive RNA polymerase. Sequencing revealed a deletion of one T residue in gene 1.0 present in this plasmid.