



УДК 577.213.39:579.252.5

РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПЛАЗМИД ГРУППЫ ColE1  
В КОНТРОЛЕ РЕПЛИКАЦИИ

Гуревич А. И., Бабий Н. И.

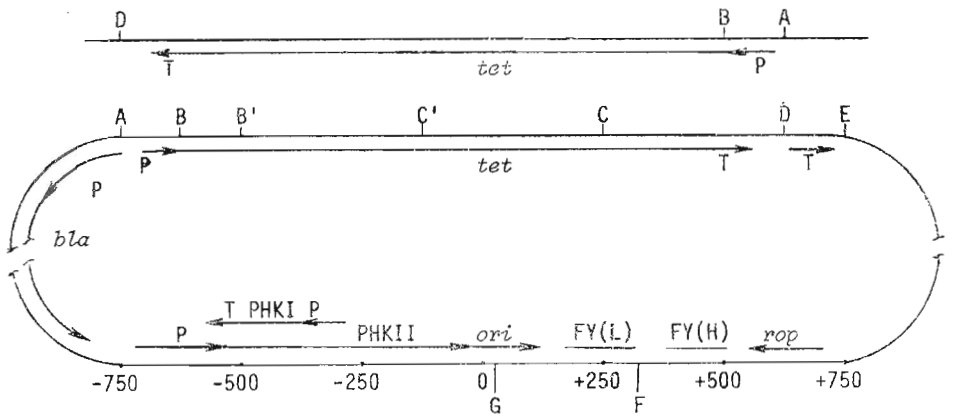
Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина  
Академии наук СССР, Москва

Изучено влияние на копияность плазмид группы ColE1 (производных pBR322) делеций в области за точкой начала репликации. Показано, что кроме известных ранее главных контролирующих элементов — РНК I с определенной вторичной структурой, белка-репрессора и эффективности промотора перед геном РНК-праймера — на репликацию плазмид оказывает влияние уровень транскрипции, распространяющейся на область репликона даже с удаленных от него промоторов. Для специфичности узнавания точки старта, по-видимому, важна структура области, непосредственно прилегающей к *ori*; делеция этой области снижает эффективность репликации.

Контроль репликации плазмид группы ColE1, а также их многочисленных производных, например pBR322, pACYC184, широко используемых для клонирования генетического материала, осуществляется под влиянием целого ряда факторов, включенных в структуру генов репликона. Репликацию плазмид этого типа инициирует синтез РНК-праймера (РНК II), старт транскрипции которой в случае pBR322 находится в положении —555 по отношению к точке начала репликации (*ori*), где РНК-праймер отщепляется РНКазой II [1]. Мутации в промоторе этой транскрипции (участок ДНК —595...—560) [2, 3] или замена его другим промотором [4] существенно сказываются на процессе репликации, что выражается в изменении копияности плазмид. Наиболее изученными контролирующими элементами структуры репликона являются гены *gor* и РНК I. Первый из них кодирует белок-репрессор праймера репликации и занимает участок ДНК +722...+532, в котором имеется сайт рестриктазы *PvuII*; делеция гена *gor* или его изменение при вставке олигонуклеотида в сайт *PvuII* приводят к ослаблению контроля репликации и увеличению копияности плазмиды в 2–3 раза [5]. Для проявления активности этот репрессор требует участия РНК I и вызывает терминацию синтеза РНК II в положении —335. Кроме того, репрессор усиливает действие самой РНК I, которое заключается в ингибировании процессинга праймера РНКазой II [6, 7]. Блокирование процессинга РНК II происходит в результате прямого взаимодействия праймера с РНК I [8, 9]. Ген РНК I расположен в участке —445...—552, так что РНК I комплементарна 5'-концевому фрагменту РНК II и образует с ним гибрид [8]. Делеция этого участка или некоторые мутации в терминаторе транскрипции РНК I, изменяющие вторичную структуру молекулы [9], приводят к резкому ослаблению контроля репликации, так что копияность плазмиды в результате мутации возрастает с 30 до 1000 [4, 10].

Значительно менее изучена функциональная роль участка ДНК, расположенного вслед за точкой *ori*. В этом участке в обеих цепях ДНК (L и H) найдены активаторные сайты фактора репликации Y (FY, или *n'*-белок) соответственно в положениях +222...+285 и +453...+424, которые могли бы служить сайтами начала репликации [11, 12]. Оказалось, однако, что эти сайты в pBR322 реально не активируют репликацию [13] и их делеция вместе с геном *gor* и значительной частью плазмидной ДНК приводит даже к некоторому уменьшению копияности.

Очевидно, что на уровень транскрипции при образовании РНК I и РНК II и, следовательно, на копияность плазмиды может также оказывать



Строение плазмид, производных pBR322. Указано положение и направление транскрипции генов; P – промоторы, T – терминаторы транскрипции; A – G – координаты ДНК, между которыми проведены делеции или вставки. Цифрами указано расстояние (н.п.) от точки начала репликации

влияние транскрипция соседних с репликоном генов. Действительно, такое влияние было отмечено в случае даже далеко расположенного сильного промотора перед геном *tet* в плазмиде [14].

Учитывая изложенное выше, мы поставили своей задачей проследить, каковы закономерности изменения копийности плазмид этой группы при изменении структуры периферийных областей репликона и удаленных от него участков плазмиды. С этой целью мы сравнили копийность серии плазмид, производных pBR322, строение которых схематически изображено на рисунке.

В эту серию плазмид вошли pBR322 [15, 16] (она содержит все элементы, приведенные на рисунке, кроме второго участка терминатора между точками D и E); pBR322mpt5 [17] (делегирован участок промотора A – B, отсутствует участок терминатора D – E); pRRN2 [18] (участок промотора A – B заменен тандемом промоторов *rnnB*, отсутствует участок терминатора D – E); pMCR1 [19] (участок A – B заменен промоторами *rnnB*, делегирован участок D – F); pMCR1t1a, pMCR1t1b [19] (производные pMCR1, содержат в терминаторном участке D – E  $\rho$ -независимый терминатор фага fd, T, в прямой и обратной ориентации); pMCR1t2a, pMCR1t2b [19] (производные pMCR1, содержат в терминаторном участке D – E  $\rho$ -независимый терминатор PHKI, T, в прямой и обратной ориентации); pMCR2 [19] (участок A – B заменен промоторами *rnnB* и вместе с геном *tet* встроены между точками A и D в обратной ориентации, делегирован участок D – G); pMCR3 (делегирован участок C – F); pMCR4 (делегирован участок A – F); pBR327 [20] (делегирован участок D – G).

Копийность плазмид мы измеряли в одном и том же штамме *E. coli* HB101 путем прямого определения количества плазмидной ДНК после гель-электрофореза и окрашивания бромистым этидием по интенсивности флуоресценции зон ДНК [5, 21]. С этой же целью по методу [22, 23] была измерена резистентность к ампициллину клеток, несущих плазмиду. В работе [22] было найдено, что зависимость между резистентностью и копийностью плазмиды носит линейный характер для плазмид с числом копий до 10. Из наших данных следует, что для более многокопийных плазмид наблюдаются существенные отклонения от линейности. Результаты измерений приведены в таблице, в которую включены также данные работы [24] о копийности плазмид pBR322-10 (делегирован участок C' – G, см. рисунок) и pBR322-4 (делегирован участок B' – G).

Как видно из таблицы, плазмиды pBR322, pBR322mpt5 и pRRN2 (№ 1–3) обладают одинаковой копийностью. Во второй плазмиде делегирован промотор гена *tet*, а в третьей плазмиде имеется более сильный промотор *rnnB*, в результате чего клетки с этой плазмидой обладают почти вдвое большей резистентностью к тетрациклину, чем pBR322 [25]. Оче-

### Копийность плазмид, производных рВR322

Номер	Плазмида	Число копий в клетке *	Концентрация ампициллина (мг/мл), при которой доля устойчивых к нему колоний составляет		
			100%	50%	10%
1	рВR322	25±5	1,5	2,5	3,0
2	рВR322mpt5	25±5	1,5	2,5	3,0
3	рRRN2	25±5	1,5	2,5	3,0
4	рВR327	30±5	2,0	3,0	4,0
5	рMCR1	60±10	2,0	3,0	4,0
6	рMCR2	30±5	1,5	2,0	3,0
7	рMCR3	20±5	1,5	2,0	3,0
8	рMCR4	90±10	3,0	4,0	5,0
9	рMCR1t1a	90±10	2,0	3,0	4,0
10	рMCR1t1b	90±10	2,0	3,0	4,0
11	рMCR1t2a	70±10	1,5	2,0	3,0
12	рMCR1t2b	70±10	1,5	2,0	3,0
13	рВR322-10	(15)	0,7 **		
14	рВR322-4	(10)	0,5 **		

\* По результатам не менее трех независимых опытов.

\*\* По данным работы [24]; число копий рассчитано нами на основании линейной зависимости от резистентности [22].

видно, что транскрипция с промотора перед геном *tet* достаточно эффективно обрывается в терминаторе этого гена и не оказывает существенного влияния на транскрипцию РНК I и РНК II. К тому же заключению приводит сравнение копииности плазмид рВR327 (№ 4) и рMCR2 (№ 6) с противоположным направлением транскрипции гена *tet*. Там, где терминатор гена *tet* делегирован, наблюдается заметное уменьшение копииности плазмид под влиянием промотора того же гена (плазмиды со сравнимой структурой прилегающих к *ori* областей: рВR322-10 и рВR322-4 (№ 13 и 14) по сравнению с рВR327 (№ 4), а также рMCR3 (№ 7) по сравнению с рMCR1 (№ 5)). Увеличение копииности плазмиды рMCR4 (№ 8), у которой делегирован участок промотора, по сравнению с рMCR1 (№ 5) свидетельствует о том, что обрыв транскрипции с промотора *rrnB* в терминаторе гена *tet*, вероятно, является все же неполным. Возможно, по этой причине вставка дополнительного терминатора в плаزمиды рMCR1t1 (а и б) (№ 9 и 10), рMCR1t2 (а и б) (№ 11 и 12) приводит к некоторому возрастанию копииности по сравнению с рMCR1 (№ 5).

Учитывая влияние транскрипции с удаленных промоторов, можно оценить и функциональную роль непосредственно прилегающего к *ori* участка ДНК. Действительно, плазмиды, в которых сохранен участок G—F, имеют более высокую копииность по сравнению со своими транскрипционными аналогами, в которых участок G—F делегирован (ср. плазмиду рMCR3 (№ 7) с рВR322-10 и рВR322-4 (№ 13 и 14), плазмиду рВR327 (№ 4) с рMCR1 (№ 5)). Мы полагаем, что расположение точки G слишком близко к *ori* (13—15 н. п.) снижает специфичность узнавания точки старта и соответственно эффективность репликации.

Таким образом, кроме известных ранее главных контролирующих элементов — РНК I с определенной вторичной структурой, белка-репрессора и эффективности промотора перед геном РНК-прайма — на репликацию плазмид оказывает влияние уровень транскрипции, распространяющейся на область репликаона даже с удаленных от него промоторов. Для эффективного старта репликации важна также структура участка длиной более 15 н. п., расположенного непосредственно вслед за точкой старта.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение компетентных клеток *E. coli* HB101 и трансформацию их плазмидами проводили по методу [26]. Плазмиды рВR322mpt5 и рВR327 предоставлены В. Г. Коробко. Плазмиды рMCR3 и рMCR4 получены соответственно из рВR322 и рВR322mpt5 в результате расщепления рестриктазой *Tth111I* по вырожденным сайтам (*Tth111I*\*) в условиях работы [27].

Остальные использованные в работе плазмиды получены нами ранее [18, 19].

Культуры клеток, содержащих плазмиды, выращивали на среде УТ с 50 мкг/мл ампициллина при 37°С до  $A_{550}$  2,0 ( $2 \cdot 10^8$  клеток/мл).

Для определения резистентности к ампициллину аликвоты полученных культур разбавляли исходной питательной средой до содержания  $10^6$  клеток в 1 мл и высевали по 100 мкл полученной суспензии на чашки с УТ-агаром, содержащие ампициллин в концентрации 0,05; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 и 6,0 мг/мл. Число колоний, выросших на среде с наименьшей концентрацией ампициллина, соответствовало рассчитанному из  $A_{550}$ .

Параллельно из тех же культур выделяли плазмидную ДНК по методу [28] и подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле (горизонтальный гель толщиной 2 мм, длиной 20 см) в буфере 40 мМ трис-ацетат, 20 мМ  $\text{AcONa}$ , 18 мМ  $\text{NaCl}$ , 1 мМ EDTA (рН 8,0) при напряжении 1,5 В/см, прокрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл) и фотографировали при освещении УФ-светом с  $\lambda$  380 нм. Для визуальной оценки количества ДНК во флуоресцирующей полосе использовали в качестве стандарта 0,5; 1, 2, 3 и 4 мкг ДНК рBR322. Кроме того, электрофорез проводили в 1% геле LGT-агарозы (Bio-Rad), после прокраски бромистым этидием флуоресцирующие зоны плазмид вырезали, дополнительно насыщали в течение 30 мин раствором бромистого этидия (1 мкг/мл), избыток красителя отмывали водой (30 мин), гель растворяли при 65°С (30 мин) в 5-кратном объеме буфера 10 мМ трис-HCl (рН 8,0) с 1 мМ EDTA и флуоресценцию измеряли по интенсивности в максимуме (510 нм) при возбуждении светом с  $\lambda$  254 нм с помощью флуоресцентного спектрофотометра Hitachi 650-60. Число копий плазмид рассчитывали с учетом числа клеток в исходной культуре и размеров плазмид.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Itoh T., Tomizawa J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2450-2454.
2. Cesarini G. J. Mol. Biol., 1982, v. 160, № 1, p. 123-126.
3. Castagnoli L., Lacatena R. M., Cesarini G. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 14, p. 5353-5367.
4. Panayiotatos N. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 6, p. 2641-2649.
5. Stueber D., Bujard H. EMBO J., 1982, v. 1, № 11, p. 1399-1404.
6. Cesarini G., Cocnelissen M., Lacatena R. M., Castagnoli L. EMBO J., 1984, v. 3, № 6, p. 1365-1369.
7. Lacatena R. M., Banner D. W., Castagnoli L., Cesarini G. Cell, 1984, v. 37, № 3, p. 1009-1014.
8. Tamm J., Polisky B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, v. 82, № 9, p. 2257-2261.
9. Dooley T. P., Tamm J., Polisky B. J. Mol. Biol., 1985, v. 186, № 1, p. 87-96.
10. Boros I., Pósfai G., Venetianer P. Gene, 1984, v. 30, № 1/3, p. 257-260.
11. Zipursky S. L., Mariani K. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 10, p. 6111-6115.
12. Mariani K. J., Soeller W., Zipursky S. L. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 10, p. 5656-5662.
13. Soeller W., Mariani K. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 23, p. 7253-7257.
14. Gentz R., Langner A., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Bujard H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 8, p. 4936-4940.
15. Sutcliffe J. G. CSH Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77-90.
16. Peden K. W. C. Gene, 1983, v. 22, № 2/3, p. 277-280.
17. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Чувпило С. А., Северцова И. В., Шингарова Л. П., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 309-312.
18. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Игошин А. В., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 557-560.
19. Гуревич А. И., Бабий Н. И., Некрасова О. В., Черпельская Е. А., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1356-1360.
20. Soberon X., Covarrubias L., Bolivar F. Gene, 1980, v. 9, № 3/4, p. 287-305.
21. Projan S. J., Carleton S., Novick R. P. Plasmid, 1983, v. 9, № 2, p. 182-190.
22. Uhlin B. E., Nordström K. Plasmid, 1977, v. 1, № 1, p. 1-17.
23. Lacatena R. M., Cesarini G. J. Mol. Biol., 1983, v. 170, № 3, p. 635-650.
24. Van der Ende A., Teertstra R., Weisbeen P. J. J. Mol. Biol., 1983, v. 167, № 3, p. 751-756.
25. Игошин А. В. Исследование некоторых регуляторных участков генома *Escherichia coli*. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР, 1982. 24 с.

26. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 240—241.  
27. Shinomiya T., Kobayashi M., Sato S. J. Biochem., 1982, v. 92, № 6, p. 1823—1832.  
28. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513—1523.

Поступила в редакцию  
7.II.1986  
После доработки  
26.V.1986

## PARTICIPATION OF STRUCTURAL ELEMENTS OF ColE1 RELATED PLASMIDS IN REPLICATION CONTROL

GUREVICH A. I., BABIY N. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Effect of deletions downstream from the replication origin on copy number of ColE1 related (pBR322 derived) plasmids has been studied. Along with main control elements (RNAI of defined secondary structure, the repressor protein, effectiveness of promoter upstream of gene of RNA primer) replication is influenced by transcription level propagated into the replicon region from promoters even in distal parts of plasmid. Structure of the region adjacent to the *ori* is important for startpoint recognition specificity, so that deletion of this region reduces the effectiveness of replication.