



УДК 547.963.32.04

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*
С СИНТЕТИЧЕСКИМ ПРОМОТОРОМ ДНК БАКТЕРИОФАГА *fd*
IN VITRO И *IN VIVO*

Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахлахчева О. Г.,
Долганов Г. М., Ревердатто С. В.

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

Изучена функциональная активность синтетической промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd*. Показано, что искусственный промотор образует с РНК-полимеразой *E. coli* прочный комплекс и обеспечивает специфическую инициацию транскрипции *in vitro*. Проведена оценка минимальных размеров промоторной области, необходимых для образования стабильного и функционирующего комплекса с ферментом. Получены рекомбинантные плазмидные ДНК, содержащие 93-звенный промотор. Показано, что синтетический промотор способен контролировать *in vivo* экспрессию гена, ответственного за устойчивость клеток *E. coli* к тетрациклину.

Начальная стадия синтеза РНК заключается во взаимодействии РНК-синтезирующего фермента — ДНК-зависимой РНК-полимеразы, с промоторными участками дезоксирибонуклеиновой кислоты с образованием бипарного комплекса, способного связывать субстраты и иницировать цепь РНК. Несмотря на возросший интерес к изучению процесса транскрипции, в настоящее время имеется весьма ограниченная информация о механизмах, по которым РНК-полимераза взаимодействует со специфическими последовательностями ДНК, о пространственной организации и функции отдельных субъединиц фермента. Для изучения функциональной топографии комплекса РНК-полимераза — ДНК мы решили использовать максимально упрощенную, однопромоторную систему, в которой фрагмент нуклеиновой кислоты, взаимодействующий с ферментом, содержал бы лишь промотор и небольшой участок гена. В качестве такого фрагмента была выбрана промоторная область G2 ДНК бактериофага *fd*, о синтезе которой комбинацией химических и ферментативных подходов сообщалось ранее [1]. Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия синтетического промотора с РНК-полимеразой *E. coli in vitro* и *in vivo* и созданию плазмид, содержащих этот регуляторный участок ДНК.

I. Активность синтетического промотора *in vitro*

Первый этап исследований заключался в определении функциональной активности промотора G2 *in vitro*. При этом необходимо было оценить минимальные размеры промоторной последовательности, требующиеся

Принятые сокращения: (MeO)₂Tg — диметокситригал, ib — изобутирил, ± — *n*-хлорфенилфосфотриэфирная связь.

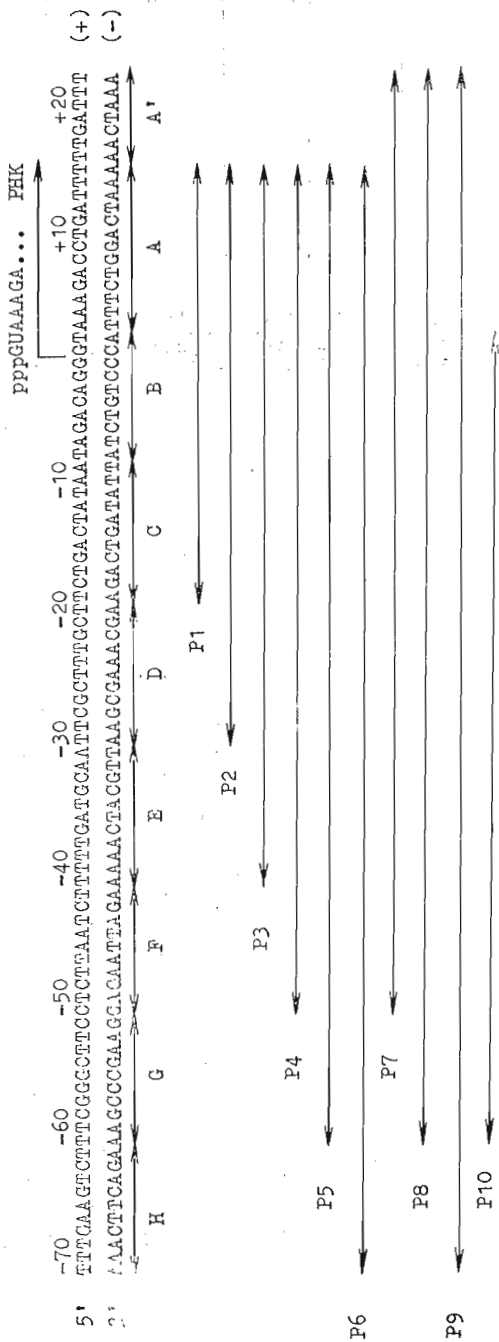


Рис. 1. Структура промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd*. P1 - P10 - фрагменты промоторной области, имеющие различную длину транскрибируемого и нетранскрибируемого районов. А, В, С, D, Е, F, G, H и А' - синтетические дезоксирибонуклеотиды, из которых построена минус-цепь дуплексов

Связывание синтетических промоторов с РНК-полимеразой
E. coli *

Дуплекс	Транскрибируемый участок, п.о.	Нетранскрибируемый участок, п.о.	Связывание с ферментом, % **	
			в 0,12 М КСl	в 0,05 М КСl, 0,1 мМ ГТФ
P1	15	19	<2,0	<2,0
P2	15	30	7,5	6,9
P3	15	41	14,2	18,2
P4	15	51	24,5	27,3
P5	15	61	50,6	50,9
P6	15	71	56,9	57,2
P7	22	51	30,3	29,5
P8	22	61	51,5	52,8
P9	22	71	58,5	59,0
P10	2	61	20,0	18,9

* Приведены усредненные результаты из пяти опытов.

** Процент связывания дуплекса с РНК-полимеразой определяли, как умноженное на 100 отношение радиоактивности, задерживающейся на нитроцеллюлозном фильтре (за вычетом фона), к радиоактивности взятого в реакцию дуплекса.

для образования стабильного и функционирующего комплекса с РНК-полимеразой.

В этих экспериментах была использована серия из 10 дуплексов длиной от 34 до 93 мононуклеотидных звеньев P1 — P10, у которых размеры нетранскрибируемого района варьировали от 19 до 71 нуклеотидной пары, а транскрибируемого района — от 2 до 22 пар (см. рис. 1). Полинуклеотиды P7, P8 и P9 были получены аналогично тому, как это было описано для дуплексов P1 — P6 [2, 3], с использованием олигонуклеотидов (A) — (H) и дополнительно синтезированного сегмента d(A-A-A-T-C-A-A) (A'). Все дуплексы были проверены на способность к комплексообразованию с РНК-полимеразой и активность в реакции транскрипции.

Связывание РНК-полимеразы с ³²P-мечеными полинуклеотидами и фиксацию образовавшихся стабильных комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах проводили как описано в работах [4, 5]. Результаты этих опытов приведены в табл. 1. Как можно видеть из таблицы, по мере увеличения длины нетранскрибируемого района эффективность комплексообразования возрастала и достигала максимума, когда размеры этого района составляли около 60 нуклеотидных пар. Дальнейшее увеличение длины промоторной области не приводило к существенному росту эффективности комплексообразования. Сравнительно меньшее влияние на связывание с РНК-полимеразой оказывало изменение размеров транскрибируемого района. Так, увеличение его длины с 15 до 22 нуклеотидных пар практически не изменяло сродства РНК-полимеразы к промотору. При уменьшении длины этого района до 2 нуклеотидных пар сродство РНК-полимеразы к промотору ослабевало и составляло приблизительно 40% от максимального связывания.

Помимо метода фиксации на нитроцеллюлозных фильтрах для доказательства существования комплексов между ³²P-мечеными синтетическими промоторами и РНК-полимеразой нами был применен электрофорез в слабе агарозы. Типичная картина, полученная при гель-электрофорезе комплекса, приведена на рис. 2. Для определения положения меченой ДНК использовалась радиоавтография. В случае комплекса полоса радиоактивности совпадала с положением белковой зоны, а не связанная с ферментом ДНК располагалась практически на фронте электрофоретического геля. При тестировании эффективности комплексообразования дуплексов P1 — P10 с РНК-полимеразой в присутствии гуанозинтрифосфата этим методом были получены результаты, полностью совпадающие с данными табл. 1, причем скорость, наглядность и хорошая воспроизводимость этого

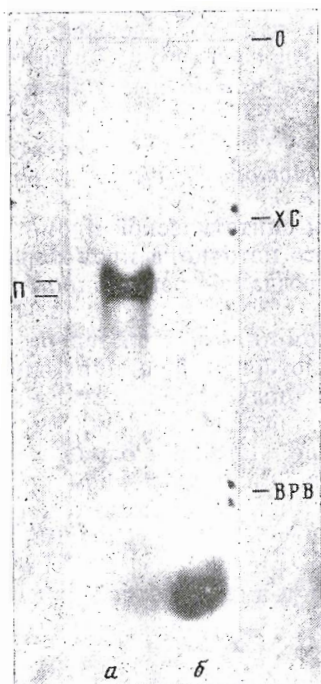


Рис. 2

Рис. 2. Электрофорез комплекса РНК-полимераза – промотор Р9 в 1,4% агарозном геле. После инкубации при 37° С в течение 10 мин в связывающем буфере, содержащем 0,12 М КСl и 0,2 мМ GTP, к смеси РНК-полимеразы и промотора (соотношение 10 : 1 моль/моль) прибавляли равный объем 20% раствора глицерина, содержащего красители-маркеры, и наносили на гель (пластина 20×20×0,2 см). Электрофорез проводили в 40 мМ трис-ацетате, рН 8,2, содержащем 5 мМ NaOAc и 1 мМ EDTA при 250 В и 30 мА. Для определения положения белковой зоны использовали прокрашивание геля кумасси. 0 – старт, XG – ксиленцианол FF, BPB – бромфеноловый голубой, П – положение РНК-полимеразы. *a* – комплекс РНК-полимераза – промотор, *b* – свидетель – промотор

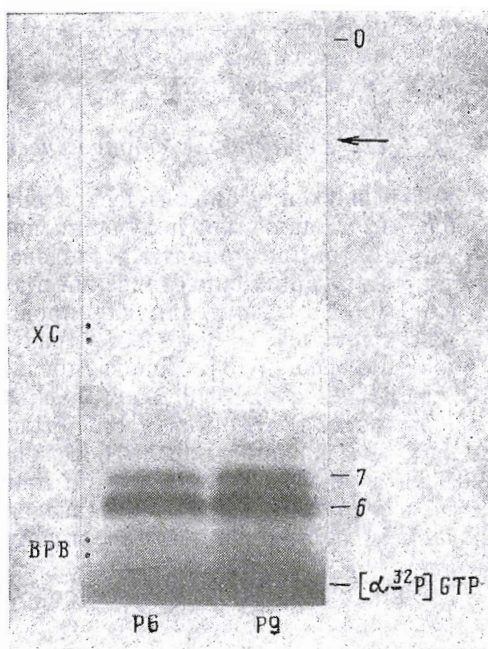


Рис. 3

Рис. 3. Электрофорез транскриптов, полученных с дуплексов Р6 и Р9 в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, УТР и АТР в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины, 0,05 М трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA. Пластина 20×20×0,1 см. 0 – старт, XG – ксиленцианол FF, BPB – бромфеноловый голубой. Положение дуплекса промотора показано стрелкой. Цифры 6 и 7 показывают положение гекса- и гептануклеотидов

способа давали ему преимущество над ранее известной техникой связывания комплекса на нитроцеллюлозных фильтрах.

Далее была исследована активность синтетических дуплексов в реакции транскрипции. При инкубации полинуклеотидов Р1 – Р9 с РНК-полимеразой в присутствии трех нуклеозидтрифосфатов $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, УТР и АТР во всех случаях, кроме промотора Р1, в качестве основного продукта были получены транскрипты длиной 6–7 рибонуклеотидных звеньев (см. рис. 3). Структура этих коротких РНК была установлена после их выделения с 20% полиакриламидного геля с помощью частичного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим фингерпринтированием [6] и соответствовала 5'-концевой последовательности G2 мРНК rrrG-U-A-A-A-G-A. Отсутствие инициации транскрипции в случае промотора Р1, содержащего только 19 нуклеотидных пар в промоторном районе, находится в соответствии с результатами о крайне слабом (<2%) его взаимодействии с РНК-полимеразой. Таким образом, для обеспечения прочного и специфического связывания с этим ферментом вполне достаточно информации, содержащейся во фрагменте промоторной области, расположенном между 51–61-м нуклеотидами нетранскрибируемого района

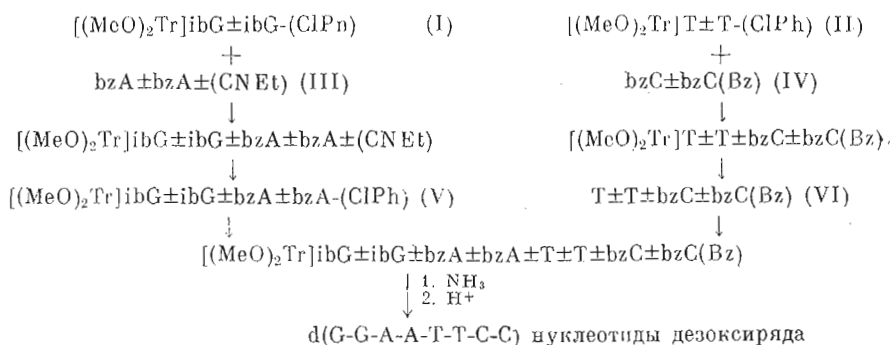
и 15–22-м нуклеотидами транскрибируемого района. Основываясь на этом, в дальнейших экспериментах по изучению взаимодействия промотора с РНК-полимеразой мы использовали промоторы и их аналоги, удовлетворяющие этому требованию.

II. Активность синтетического промотора *in vivo*

С целью изучения биологической активности синтетической промоторной области, а также для получения постоянного источника промоторной ДНК нами были предприняты исследования по созданию рекомбинантных плазмид, содержащих синтетический промотор.

Удобными векторами для клонирования промоторов являются бактериальные плазмиды, в которых утрачена промоторная функция одного из генов-маркеров [7, 8]. Конструирование подобных векторов на основе плазмид рBR322 и рBR316 и их использование для клонирования промоторсодержащих фрагментов ДНК было недавно описано Родригесом с соотр. [9]. Эти плазмиды были получены заменой или удалением функционально важных участков внутри промотора гена, кодирующего устойчивость к тетрациклину (T_c^R), и введением в эту область нуклеотидной последовательности, узнаваемой эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*, что приводило к инактивации T_c^R -гена и приобретению клеткой фенотипа T_c^S . Один из векторов этой серии, рBRH4, был нами использован при клонировании синтетической промоторной области.

Встраивание в рBRH4 по *EcoRI*-«сайту» синтетического промотора должно восстанавливать активность гена T_c^R в случае совпадения ориентации этих генетических элементов. При этом штамм, несущий эту плазмиду, должен приобретать устойчивость к большим концентрациям антибиотика, что в свою очередь является удобным признаком для селекции рекомбинантных плазмид.



Для введения в векторную молекулу была взята 93-звенная промоторная область P9, содержащая 71 п. о. в промоторном районе и 22 п. о. в транскрибируемом районе. Прежде всего промотор необходимо было снабдить «липкими» концами, соответствующими нуклеотидной последовательности, генерируемой эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*. Это осуществлялось нами с помощью самокомплементарного октануклеотида d(G-G-A-A-T-T-C-C), синтез которого проводился модифицированным триэфирным методом, как показано на схеме [10]. «Линкер» присоединяли к обоим тупым концам 93-звенной промоторной области P9 посредством лигазной сшивки встык («blunt end ligation») и продукт лигазной реакции обрабатывали эндонуклеазой *EcoRI* (см. рис. 4).

Полученный 97-звенный двухцепочечный полинуклеотид с выступающими тетра- и три-нуклеотидными последовательностями (P9E) сшивали с избытком предварительно обработанной эндонуклеазой *EcoRI* ДНК плазмиды рBRH4 с помощью T4-ДНК-лигазы и рекомбинантной ДНК трансформировали клетки *E. coli* HB101 [11] (см. рис. 5). Селекцию кло-

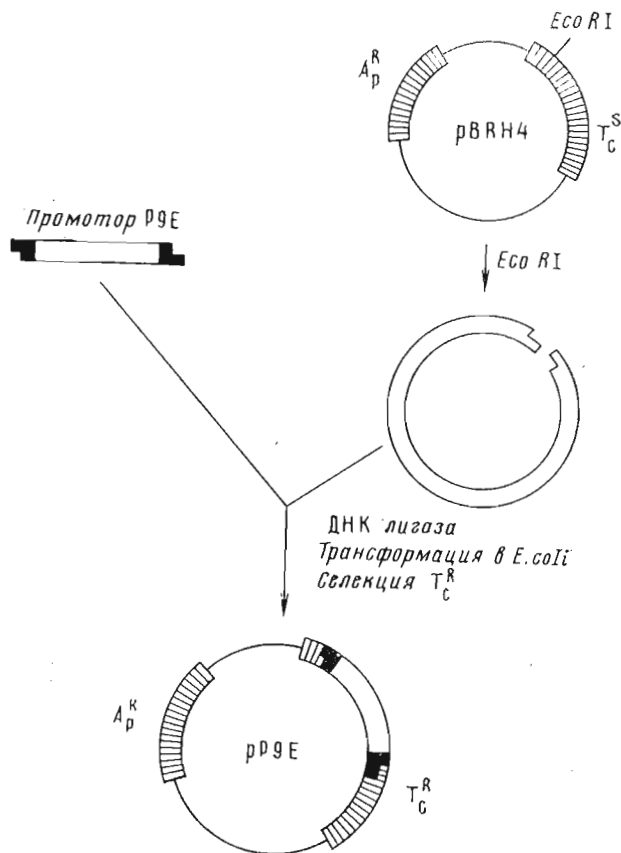


Рис. 5. Схема получения гибридной плазмиды (pP9E), содержащей синтетический промотор ДНК бактериофага *fd*

нов проводили на чашках с агаром по признаку устойчивости к повышенным концентрациям тетрациклина. Было отобрано 29 колоний со средним уровнем устойчивости к тетрациклину 60–100 мкг/мл. (Для сравнения: уровень T_c^R , сообщаемый клеткам плазмидой pBRH4 ≤ 2 мкг/мл, а уровень pBR322 70–75 мкг/мл.) Очистку плазмидной ДНК проводили комбинированным методом, включающим щелочную экстракцию в присутствии додецилсульфата натрия [12] и центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия. Из 1 г клеток в среднем получалось 1–1,5 мг суперскрученной ДНК. Выделенная из клонов ДНК была подвергнута электрофорезу в 1,2% агарозе до и после обработки *EcoRI*. Было найдено, что все 29 образцов ДНК расщепляются этим ферментом и что размеры гибридных плазмид близки к плазмиде pBR322.

С целью обнаружения промоторного фрагмента ДНК восьми из 29 клонов была расщеплена эндонуклеазой *EcoRI* и обработана щелочной фосфатазой *E. coli* для удаления 5'-фосфатных групп с выступающих концов рестриктных фрагментов. Далее с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-полинуклеотидкиназы в полученные фрагменты была введена 5'-концевая радиоактивная метка, и они были подвергнуты электрофорезу в 10% полиакриламидном геле. Во всех восьми случаях был обнаружен полинуклеотид длиной приблизительно 100 нуклеотидных звеньев, причем относительная интенсивность радиоактивных зон, соответствующих этому малому фрагменту ДНК (промоторная область) и большому рестриктному фрагменту (находится около старта электрофоретического геля и представляет собой всю остальную часть плазмиды), составляла

1:1 для шести образцов, а в клонах pP9E18 и pP9E26 — соответственно 2:1 и 3:1. Последнее обстоятельство свидетельствовало о том, что в эти плазмиды встроилось, вероятно, по 2 и 3 копии промотора одновременно.

Структура клонированного промотора была подтверждена методом Макама — Гилберта [13] после денатурации и разделения 5'-меченых цепей фрагментов электрофорезом в 6% полиакриламидном геле. Нуклеотидная последовательность, выведенная на основании структурного анализа, была полностью идентична последовательности промотора P9E и ее длина составляла 101 нуклеотид (см. рис. 4).

Из вышеизложенных данных следует, что синтетическая промоторная область, полученная с использованием двух новых химико-ферментативных подходов [1], функционально активна в реакциях с РНК-полимеразой *E. coli in vitro*, т. е. образует с ферментом прочный комплекс и обеспечивает специфическую инициацию транскрипции. Этот фрагмент ДНК является также эффективным стартовым сигналом транскрипции *in vivo*, как показало исследование возможности экспрессии гена T_c^R под контролем синтетического промотора в составе бактериальной плазмиды. Кроме того, полученные рекомбинантные плазмиды могут быть использованы как удобный источник промоторной ДНК для проведения различных биохимических и физико-химических исследований, в частности рентгеноструктурного анализа комплекса промотора с РНК-полимеразой.

Экспериментальная часть

В работе использованы мононуклеотиды производства СКТБ БАВ Главмикробиопрома, дезоксирибонуклеозиды производства фирмы Sigma (США), рибонуклеозидтрифосфаты (P-L Biochem., США), 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид и трис (Merk, ФРГ), ацетилцеллюлоза (Schleicher und Schüll, ФРГ), целлюлоза MN-300 и DEAE-целлюлоза MN-300 (Serva, ФРГ), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (Amersham, Англия), акриламид, N,N-метиленабисакриламид (Merk, ФРГ), щелочная фосфатаза *E. coli* (ВАРФ) и фосфодиэстераза змеиного яда (Worthington, США), эндонуклеаза *EcoRI* и S_1 -нуклеаза *Aspergillus oryzae* (P-L Biochem., США). Т4-полинуклеотидкиназа и Т4-полинуклеотидлигаза были выделены по методу [14].

Очищенный бактериофаг *fd* и одноцепочечную ДНК выделяли как описано Марвином и Шаллером [15], за исключением того, что фаг очищали осаждением полиэтиленгликолем [16]. Радиоактивность определяли с помощью сцинтилляционного счетчика Mark II (Nuclea Chicago, США). 5'- ^{32}P -меченые препараты олигонуклеотидов получали с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ и Т4-полинуклеотидкиназы, как это было описано ранее [2]. Фосфорилирование длинных фрагментов ДНК с помощью Т4-полинуклеотидкиназы проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 9,0), 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ дитиотреит и 10 мкКи/50 мкл $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ в течение 30 мин.

ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* была выделена из клеток *E. coli* MRE-600, как описано ранее [17]. Активность полного фермента (450 ед. акт./мг) определяли с использованием в качестве матрицы ДНК тимуса теленка (Worthington, США), а его чистоту — электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Химический синтез гептадезоксирибонуклеотида $d(\text{A-A-A-T-C-A-A})$ был осуществлен фосфодиэфирным методом, исходя из пента-нуклеотида $d[(\text{MeOTr})\text{bzA-bzA-bzA-T-anC}]$ и динуклеотида $d[\text{pbzA-bzA}(\text{Ac})]$ с выходом 45% аналогично тому, как это было описано ранее для олигонуклеотидов (A) — (H) [2, 3]. «Линкер» $d(\text{G-G-A-A-T-T-C-C})$ был получен модифицированным триэфирным методом [10], в качестве основных строительных блоков были использованы полностью защищенные динуклеотиды.

Условия проведения межнуклеотидных конденсаций при синтезе «лишкера» фосфоритриэфирным методом *

Олигонуклеотид	P-компонент, ммоль	OH-компонент, ммоль	TPSTe, ммоль	Выход, %
[(MeO ₂ Tr)ibG±-ibG-(ClPh) (I)	[(MeO) ₂ Tr]ibG-(ClPh) (20)	dibG± (CNEt) (10)	40	24
[(MeO) ₂ Tr]T±T-(ClPh) (II)	[(MeO) ₂ Tr]T-(ClPh) (25)	dT± (CNEt) (15)	37	77
bzA±bzA±(CNEt) (III)	[(MeO) ₂ Tr]bzA-(ClPh) (15)	dbzA±(CNEt) (10)	30	51
bzC±bzC(Bz) (IV)	[(MeO) ₂ Tr]bzC-(ClPh) (12)	dbzC(Bz) (6)	24	85
[(MeO) ₂ Tr]ibG±ibG±bzA±-bzA-(ClPh) (V)	(I) (0,4)	(III) (0,25)	0,8	56
T±T±bzC±bzC(Bz) (VI)	(II) (0,4)	(IV) (0,2)	0,8	94
[(MeO) ₂ Tr]ibG±ibG±bzA±bzA±T±T±bzC±bzC(Bz)	(V) (0,06)	(VI) (0,04)	0,2	35

* Символ d для обозначения дезоксиряда везде опущен, TPSTe — 2,4,6-тринизопропилбензол-сульфотетразолид.

Выходы продуктов на каждой стадии конденсации и условия проведения реакций приведены в табл. 2. Очистку октануклеотида после удаления защитных групп проводили анионообменной хроматографией под высоким давлением на смоле Pellionex SAX (Reeve angel, США). Структуру олигонуклеотидов подтверждали фингерпринтированием 5'-³²P-меченых препаратов по методу Сенгера [6].

Электрофорез олиго- и полинуклеотидов в полиакриламидном геле осуществляли в вертикальных слабах (см. рис. 3).

Комплексообразование РНК-полимеразы с синтетическими промоторами проводили при 37° С в 120 мМ KCl, содержащем 20 мМ трис-HCl (рН 8,0), 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит, 5% глицерин (связывающий буфер). 1 пмоль дуплекса (~100 000 имп/мин) и 10 пмоль фермента инкубировали в 100 мкл связывающего буфера в течение 10 мин, раствор разбавляли 900 мкл того же буфера, содержащего 14 мкг одноцепочечной ДНК фага fd, выдерживали еще 10 мин и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (тип HA, диаметр пор 0,45 мкм, Millipor Corp., США). Фильтр промывали 2 мл того же буфера, спиртом, высушивали и просчитывали на сцинтилляционном счетчике. Комплексообразование в присутствии 0,1 мМ GTP проводили в 50 мМ KCl в условиях работы [4].

Для анализа комплексов РНК-полимераза — промотор использовали также электрофорез в 1,4% агарозном геле (см. рис. 2).

Получение транскриптов с синтетических промоторов. 1 пмоль дуплекса инкубировали с РНК-полимеразой (4 пмоль, 2 мкг) в 25 мкл буфера, содержащего 40 мМ трис-HCl (рН 7,9), 50 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA в присутствии трех нуклеозидтрифосфатов: [α -³²P]GTP (0,12 мМ, 50 Кп/ммоль), UTP (0,2 мМ) и ATP (0,2 мМ) в течение 10 мин при 37° С, прибавляли 20 мкл 10 М мочевины, содержащей смесь красителей, и подвергали электрофорезу в 20% полиакриламидном геле (см. рис. 3). Транскрипты элюировали с геля 0,5 М ацетатом аммония, содержащим 0,1% додецилсульфат натрия и 1 мМ EDTA, осаждали тремя объемами спирта при -20° С, осадок отделяли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 5 мин, растворяли в 0,01 М трис-HCl и подвергали частичному гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда с последующей двухмерной гомохроматографией, как это было описано ранее [2].

Обработку плазмидных ДНК эндонуклеазой рестрикции EcoRI проводили при 37° С в течение 1 ч в растворе, содержащем 100 мМ трис-HCl (рН 7,5), 5 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl и 1 мМ дитиотреит.

Получение гибридной плазмидной ДНК. Синтетический «линкер» (30 пмоль) и 93-звенный промотор P9 (0,5 пмоль) инкубировали с 5 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы в 50 мкл раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ дитиотреит, 10 мМ MgCl₂ и 40 мкМ АТР при 20° С в течение 12 ч. Реакционную смесь прогревали при 70° С 3 мин для инактивации фермента и медленно охлаждали до 20° С. Затем ДНК высаживали двумя объемами спирта, выдерживали 2 ч при -20° С и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Осадок растворяли в 50 мкл раствора, содержащего 100 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl и 1 мМ дитиотреит, прибавляли 10 мкг ДНК плазмиды pBRN4 и 4 ед. акт. эндонуклеазы EcoRI. Образец инкубировали при 37° С 3 ч, затем прогревали 3 мин при 70° С, медленно охлаждали и ДНК осаждали спиртом. Осадок растворяли в 50 мкл раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 40 мкМ АТР, и инкубировали при 10° С в течение 16 ч с 5 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы. Полученная таким образом гибридная ДНК прямо использовалась для трансформации клеток *E. coli*.

Трансформацию клеток E. coli K12 HB 101 [F⁻pro-leu⁻thi⁻gal⁻lacY⁻str^r-m⁻Endol⁻recA⁻] [11] проводили по модифицированному методу [18]. Для приготовления компетентных клеток к 100 мл бульона LB [19] прибавляли 2,5 мл ночной культуры и клетки выращивали при 37° С до мутности D₅₉₀ 0,8. Культуральную жидкость (80 мл) быстро охлаждали до 0° С и бактериальные клетки отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 мин. Все дальнейшие операции проводили при 0° С. Осадок суспендировали в 40 мл 0,1 М MgCl₂, клетки снова осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 20 мл 30 мМ CaCl₂, содержащего 50 мкг/мл тимидина. Смесь выдержали 30 мин при 0° С, центрифугировали и осадок вновь суспендировали в 4 мл 30 мМ CaCl₂. К 100 мкл раствора ДНК в том же буфере добавляли 200 мкл суспензии компетентных клеток, инкубировали 40 мин при 0° С, 5 мин при 37° С и 10 мин при 0° С. Затем в каждую пробу добавляли по 5 мл бульона LB и после 45—60 мин инкубации при 37° С клетки отделяли центрифугированием (5 мин при 4000 об/мин), ресуспендировали в 200 мкл LB-бульона и аликвоты высевали на чашки с 1,2% агаром LB, содержащим 50 мкг/мл ампициллина и различные концентрации тетрациклина (0, 5, 10 и 20 мкг/мл). Было получено в среднем 3—5·10⁶ колоний на 1 мкг трансформируемой ДНК.

Селекцию по фенотипу T_c^r проводили на чашках с 1,2% LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина и от 10 до 150 мкг/мл тетрациклина с интервалом в 10 мкг.

Выделение плазмидной ДНК. Культуры плазмидсодержащих штаммов *E. coli* выращивали при 37° С в среде LB с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) до концентрации 10⁸ клеток/мл. Амплификацию ДНК проводили по Клевелу [20] в присутствии хлорамфеникола (150 мкг/мл) в течение 16—20 ч. Плазмидную ДНК выделяли методом быстрой щелочной экстракции в присутствии додецилсульфата натрия [12], а затем дополнительно очищали следующим образом. ДНК осаждали спиртом, растворяли в 50 мМ трис-НСl-буфере (рН 8,0), содержащем 1 мМ EDTA (25 мл буфера на 1 г использованной биомассы). К 25 мл раствора ДНК добавляли 0,25 мл бромистого этидия (10 мг/мл) и 25 г хлористого цезия, центрифугировали при 50 000 об/мин в течение 40 ч при 20° С (Spinco L5, ротор Т60), отбирая фракции суперскрученной плазмидной ДНК. Бромистый этидий удаляли фильтрацией через дауэкс-50. ДНК диализовали 4 ч против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 8,0) и 1 мМ EDTA, осаждали этанолом и растворяли в том же буфере (концентрация 0,5 мг/мл).

Авторы признательны Р. Л. Родригесу (США) за предоставление образца плазмиды pBRN4 и члену-кор. АН СССР Г. П. Георгиеву за помощь в организации экспериментов. Работа выполнена в соответствии с требо-

ваниями «Временных правил безопасности работ с рекомбинантными ДНК» по классу К-1 с применением физического уровня защиты Ф-2 (Р-2) и биологического Б-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Efimov V. A., Chakhmakheva O. G. (1979) FEBS Letters, **100**, 341–346.
2. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. (1979) Биоорган. химия, **5**, 1329–1340.
3. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. (1979) Биоорган. химия, **5**, 1782–1792.
4. Okamoto T., Sugimoto K., Sugisaki H., Takunami M. (1977) Nucl. Acids Res., **4**, 2213–2222.
5. Seeburg P. H., Nusslein C., Schaller H. (1977) Eur. J. Biochem., **74**, 107–113.
6. Sanger F. (1973) in: Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds), pp. 573–599, Acad. Press, New York – London.
7. An G., Friesen G. D. (1979) J. Bacter., **140**, 400–407.
8. Videra G., Gautier F., Sindenmaier W., Collins J. (1978) Mol. Gen. and Genet., **163**, 301–305.
9. Rodriguez R. L., West R. W., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. (1979) Nucl. Acids Res., **6**, 3267–3287.
10. Crea R., Hirose T., Itakura K. (1979) Tetrahedron Lett., 395–398.
11. Bolivar F., Rodriguez R. L., Betlach M. C., Boyer H. W. (1977) Gene, **2**, 75–93.
12. Birnboim H. G., Doly J. (1979) Nucl. Acids Res., **7**, 1513–1523.
13. Gilbert W., Maxam A. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 560–564.
14. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. (1973) Biochemistry, **12**, 5045–5050.
15. Marvin D. A., Schaller H. (1966) J. Mol. Biol., **15**, 1–7.
16. Seeburg P. H., Schaller H. (1975) J. Mol. Biol., **92**, 261–277.
17. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г., Скиба Н. П., Ляпкин В. М., Модянов Н. Н. (1979) Биоорган. химия, **5**, 1410–1421.
18. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 2110–2114.
19. Миллер Дж. (1976) Эксперименты в молекулярной генетике, с. 395, «Мир», М.
20. Clewell D. B. (1972) J. Bacteriology, **110**, 667–676.

Поступила в редакцию
3.VII.1980

INTERACTION OF *E. coli* RNA-POLYMERASE WITH A SYNTHETIC PROMOTER OF BACTERIOPHAGE *fd* DNA *in vitro* AND *in vivo*

OVCHINNIKOV Yu. A., EFIMOV V. A., CHAKHMAKHEVA O. G.,
DOLGANOV G. M., REVERDATTO S. V.

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

Ten double-stranded polynucleotides representing variants of G2 promoter of phage *fd* DNA with different sizes of transcribed and non-transcribed regions were used for determination of promoter sizes required for the formation of a stable and functional complex with *E. coli* RNA polymerase. All duplexes were tested in nitrocellulose filter binding assay for the ability to interact with RNA polymerase and in transcriptional assay. It was shown that the lengthening of non-transcribed region increases the efficiency of complex formation which comes up to its maximum when the size of this region is approaching 60 base-pairs. Further lengthening of non-transcribed region does not result in an essential increase of the complex formation efficiency. The change in sizes of the transcribed region has comparatively smaller effect on the binding to RNA polymerase. As was determined by transcript size and transcript fingerprint analysis, all promoters with the exception of a promoter, containing 19 basepairs in non-transcribed region, provided proper initiation of transcription. To examine the *in vivo* properties of the synthetic promoter and to obtain a convenient permanent source of a promoter DNA, 93-base-pair-long promoter was cloned in a bacterial plasmid. An oligonucleotide duplex containing *EcoRI* restriction enzyme recognition sequence was joined to both ends of the promoter by blunt-end ligation. The resulting DNA was cleaved by the same restriction enzyme to generate specific cohesive ends and then it was fused to plasmid pBRH4, cleaved by *EcoRI* nuclease. *E. coli* was transformed with the recombinant DNA. It was shown that T_c^R level encoded by the hybrid plasmid carrying G2 promoter was about 60–100 $\mu\text{g/ml}$ of T_c .