



УДК 547.963.32.04

МОДИФИКАЦИИ ПРОМОТОРА ГЕНА *tet* В ПЛАЗМИДЕ pBR322

Коробко В. Г., Добрынин В. И., Северцова И. В.,  
Чувпило С. А., Шингарова Л. И., Колосов М. И.

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

Недавно нами были синтезированы 39- и 49-членные двухцепочечные ДНК [1], содержащие большую часть «идеальной» промоторной последовательности, предложенной Шерером и др. [2] на основании статистического анализа структуры известных прокариотических промоторов. С помощью этих синтетических ДНК мы осуществили направленную замену в плазмиде pBR 322 двух участков промотора гена устойчивости к тетрациклину *tet* и получили рекомбинантные ДНК, изображенные на рис. 1.

Первая из модификаций промотора *tet* (*mpt1*) заключалась в том, что плазида pBR322 была гидролизована эндонуклеазами *EcoRI* и *HindIII*, затем обработана бактериальной щелочной фосфатазой и лигирована с 5'-фосфорилированной 39-членной синтетической ДНК [1], обозначенной А на рис. 1. После трансформации *E. coli* HB101 и клонирования на среде с ампициллином были отобраны тетрациклиноустойчивые трансформанты, плазмидная ДНК которых расщепляется эндонуклеазой *HindIII* на три фрагмента величиной 470, 630 и 3200 пар оснований. При анализе этой плазмиды по методу [3] была определена 120-нуклеотидная последовательность, центральная часть которой идентична синтетической ДНК А (рис. 1, I), а обе боковые части точно соответствуют первичной структуре pBR322, опубликованной Сатклиффом [4].

Вторая синтетическая ДНК, 49-членная [1], имела выступающий 3'-конец GTAC, и для ее рекомбинации с pBR322 было необходимо ввести в последнюю рестриктный сайт *KpnI*, отсутствующий у этой плазмиды. С этой целью мы синтезировали фосфотриэфирным методом, как описано в статье [3], тетрадекадезоксинуклеотид А-G-C-T-A-T-A-A-T-G-G-T-A-C и гексадезоксинуклеотид С-А-Т-Т-А-Т, который 5'-фосфорилировали Т4-полинуклеотидкиназой. При соединении первого олигонуклеотида с 5'-фосфатом второго (взятым в 2-кратном избытке) под действием Т4 ДНК-лигазы был получен с практически количественным выходом 20-мер А-G-C-T-A-T-A-A-T-G-G-T-A-C-C-A-T-T-A-T, строение которого подтверждено анализом нуклеотидных карт и модифицированным методом Максама — Гилберта. Вследствие частичной самокомплементарности этот эйкозануклеотид существует в виде 16-членного дуплекса с 5'-выступающими концами А-G-C-T (рис. 1, B), благодаря чему после 5'-фосфорилирования он гладко лигировался с плазмидной pBR322, предварительно обработанной эндонуклеазой *HindIII* и щелочной фосфатазой. Трансформацию и клонирование проводили как описано выше. Выделенная из  $Ar^+Tc^+$ -транс-

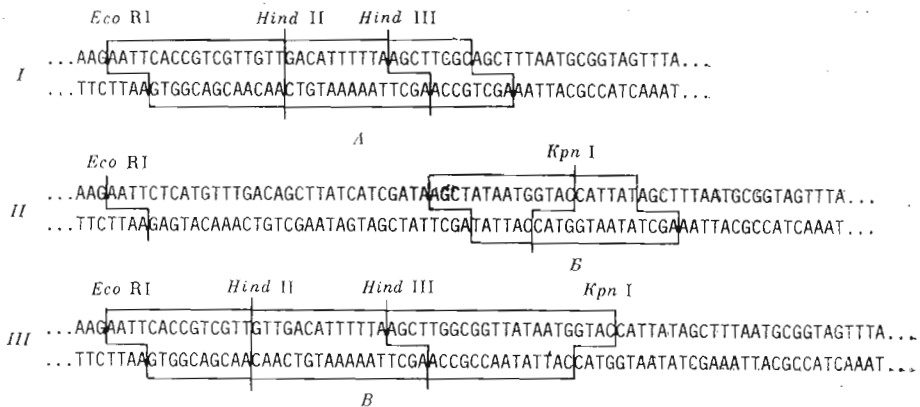


Рис. 1. Частичная нуклеотидная последовательность рекомбинантных плазмид рВR322mpt1 (I), рВR322mpt2 (II) и рВR322mpt3 (III). В рамки заключены синтетические фрагменты ДНК: А [1] — замещение *EcoRI/HindIII*-фрагмента в рВR322, В синтезирован в настоящей работе — вставка по *HindIII*-сайту в рВR322, В [1] — замещение *EcoRI/KpnI*-фрагмента в рВR322mpt2

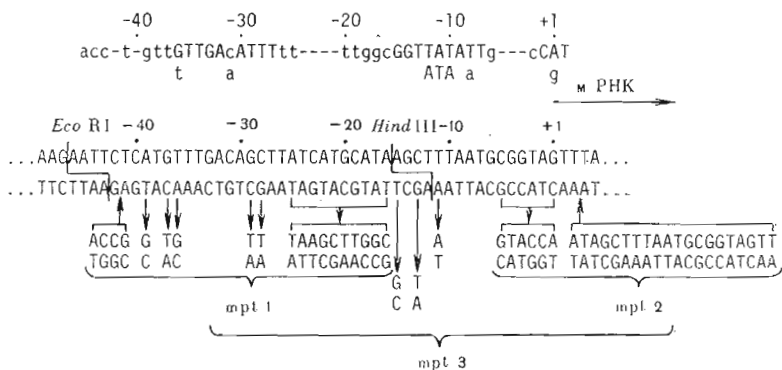


Рис. 2. Гипотетический «идеальный» промотор ( $P_{hyp}$ ) Шерера и др. [2] и промотор гена устойчивости к тетрациклину в плазмиде рВR322 дикого типа ( $P_{tet}$ ) и ее мутантах. Показаны вставки и замены, составляющие мутации mpt1 и mpt2; мутация mpt3 является суммой mpt1 + mpt2 + две указанные транзиции в положениях —13 и —15

формантов модифицированная плазмида рВR322mpt2 была отобрана по способности расщепляться *KpnI* и устойчивости к *HindIII*; ее нуклеотидная последовательность II (рис. 1) доказана теми же методами, что и в случае предыдущей плазмиды.

Третья модификация аналогично первой состояла в замене участка плазмиды между двумя рестриктовыми сайтами на синтетический дуплекс, но рекомбинирующими ДНК здесь являлись рВR322mpt2 и синтетический *EcoRI/KpnI*-фрагмент В. После трансформации *E. coli* НВ101 проводилась селекция  $Ap^+Tc^+$ -клонов на присутствие в плазмиде рестриктных сайтов *HindIII* и *KpnI*. В результате была выделена рекомбинантная плазмида рВR322mpt3, структура которой (рис. 1, III) доказана определением нуклеотидной последовательности синтетической вставки и прилегающих к ней участков ДНК.

В полученных нами рекомбинантных плаزمиде модифицированы различные функциональные части промотора  $P_{tet}$  (рис. 2): в mpt1 — область «узнавания» РНК-полимеразы [5], в mpt2 — участок связывания РНК-полимеразы (Прибноу-бокс [6]) и старт транскрипции, в mpt3 — обе части одновременно, причем во всех случаях модифицированная структура точно соответствует гипотетической промоторной последовательности ( $P_{hyp}$ ) Ше-

пера и др. [2]. Промотор  $P_{tet}$  дикого типа был охарактеризован Родригесом и др. [7], которые исследовали также ряд вставок и делеций перед сайтом *Hind*III и нашли, что все они, за единственным исключением, вызывают потерю устойчивости к тетрациклину, т. е. инактивацию гена *tet*. Мы не определяли максимального уровня тетрациклиноустойчивости штаммов *E. coli*, несущих рекомбинантные плазмиды pBR322mpt1, mpt2 и mpt3, однако из условий селекции трансформантов (при концентрации тетрациклина 25—35 мкг/мл) очевидно, что он имеет величину по крайней мере того же порядка, что и у плазмиды pBR322 дикого типа.

Таким образом, из результатов этой работы следует, что постулированная Шерером и др. [2] «идеальная» промоторная последовательность действительно обеспечивает специфическое связывание РНК-полимеразы и эффективную инициацию транскрипции ДНК-матрицы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Колосов М. Н. (1980) Биоорг. химия, 6, 783—785.
2. Scherer G. E. F., Walkinshaw M. D., Arnott S. (1978) Nucl. Acids Res., 5, 3759—3777.
3. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н., Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Копелинская Т. В., Лисенков А. Ф., Дубинин Н. П. (1979) Биоорг. химия, 5, 1802—1815.
4. Sutcliffe J. G., (1978) in: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., vol. XLIII, pp. 77—90.
5. Gilbert W. (1976) in: RNA Polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds), pp. 193—195, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
6. Priebnow D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 784—788.
7. Rodriguez R. L., West R. W., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. (1979) Nucl. Acids Res., 6, 3267—3287.

Поступило в редакцию  
4.VII.1980

#### MODIFICATIONS OF THE PROMOTER OF GENE *tet* IN PLASMID pBR 322

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., SEVERTSOVA I. V.,  
CHUVELO S. A., SHINGAROVA L. N., KOLOSOV M. N.

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

Short synthetic DNAs containing a model promoter sequence of Scherer et al. [2] or fragments thereof were used to modify a tetracycline resistance gene *tet* in plasmid pBR322. One of the modifications (mpt1) was a substitution in the plasmid of the *Eco*RI/*Hind*III fragment, while another one (mpt2) was an insertion into the *Hind*III site of a 24 b.p. sequence containing a *Kpn*I site; the third mutant (mpt3) resulted from a substitution of the *Eco*RI/*Kpn*I fragment in pBR322mpt2 by a synthetic duplex of about the same length. The three modifications were found to cause no loss of the antibiotic resistance, the potency of the model promoter sequence being thus experimentally verified.