



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.07

ПРОМОТОРНЫЕ ВЕКТОРЫ С СИНТЕТИЧЕСКИМ УЧАСТКОМ
УЗНАВАНИЯ РИБОСОМЫ*Горобко В. Г., Добрынин В. Н., Чувпило С. А.,
Северцова И. В., Колосов М. И.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Ранее нами была синтезирована 67-членная ДНК (формула *H* в статье [1]), которая содержит «идеальный» промотор вместе с участком связывания рибосомы *E. coli* и имеет 5'-выступающий ААТТ-конец для встраивания в *EcoRI*-сайт клонирующего вектора, а также ровный конец для лигирования встык с клонируемым геном. Лигирование встык является универсальным приемом, благодаря чему эта ДНК может служить промоторным линкером для любых структурных генов, имеющих ровные концы. Однако для клонирования синтетических генов, которые могут быть заранее снабжены желаемыми 5'- или 3'-выступающими последовательностями, было бы удобнее располагать специальными векторами, имеющими уникальные рестриктные сайты и способными обеспечить эффективную транскрипцию и трансляцию вставленного в них структурного гена. В связи с этим мы сконструировали два плазмидных вектора, которые содержат синтетический участок связывания рибосомы, фланкированный с одной стороны искусственным или природным промотором, а с другой — рестриктным сайтом *BamHI*.

Первый из этих векторов был получен на основе плазмиды pBR322 в результате замены ее фрагмента *EcoRI/BamHI* синтетическим 61-членным дуплексом, левая часть которого содержит нуклеотидную последовательность «идеального» промотора, а верхняя цепь правой части комплементарна 3'-концевому декануклеотиду 16S рРНК *E. coli*, т. е. кодирует 10-членную последовательность Шайна — Дальгарно в матричной РНК. Для конструирования этого дуплекса (рис. 1) были использованы полученные ранее олигонуклеотиды (I) — (VII) [2] и (VIII), (IX) [4], а также додекануклеотид (X), специально синтезированный для этой цели фосфотриэфирным методом с триизопропилбензолтетразолидом в качестве конденсирующего реагента.

Энзиматическая сшивка синтетических олигонуклеотидов была осуществлена с помощью Т4-ДНК-лигазы в три этапа. Сначала проводили два пятикомпонентных лигирования — [(I) + (pIII) + (pV)] · [(pII) + (pIV)] и [(pVII) + (pIX)] · [(pVI) + (pVIII) + (X)], а затем образовавшиеся дуплексы (XI) · (pXII) и (pXIII) · (XIV) хроматографией на сефадексе G-50 отделяли от не вступивших в реакцию олигонуклеотидов и сшивали между собой. Для доказательства структуры полученного дуплекса (XV) · (XVI) 3'-конец его нижней цепи селективно достраивали ДНК-

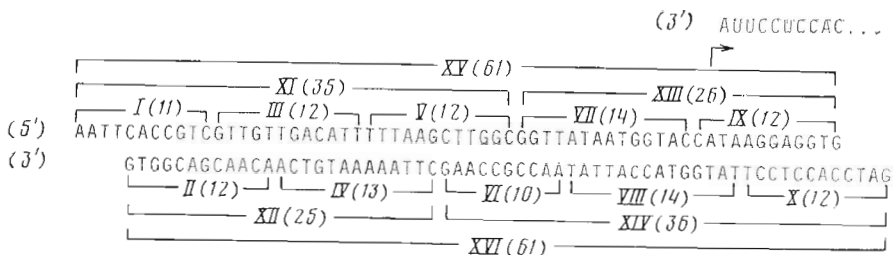


Рис. 1. Синтетический промотор с участком связывания рибосомы и 3'-концевая последовательность 16S рРНК *E. coli*. Стрелкой показаны старт и направление транскрипции. Римскими цифрами обозначены синтезированные олигонуклеотиды и продукты их лигазной сшивки, в скобках указана их величина (число мононуклеотидных звеньев)

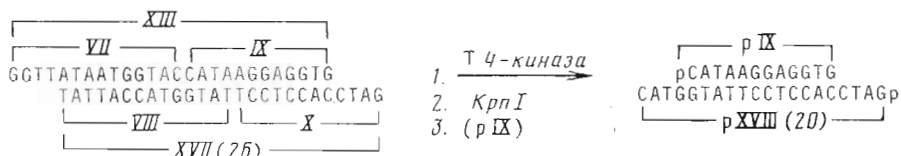


Рис. 2. Схема синтеза *KpnI/VamHI*-фрагмента ДНК, имеющего нуклеотидную последовательность Шайна — Дальгарно. Обозначения те же, что в подписи к рис. 1

полимеразой I (фрагмент Кленова) с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ и dTTP , меченую цепь выделяли электрофорезом в 15% денатурирующем полиакриламидном геле (ПАГ) и нуклеотидную последовательность определяли модифицированным методом Максама — Гилберта.

Синтезированный дуплекс (XV) · (XVI) 5'-фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой, затем лигировали с большим *EcoRI/VamHI*-фрагментом плазмиды pBR322 и полученным веществом трансформировали компетентные клетки *E. coli HB101*. Трансформанты выращивали на среде с ампициллином (50 мкг/мл), отбирали Ap^rTc^s -колонии и из них выделяли плазмидную ДНК. Для доказательства структуры эту плазмиду, обозначенную pBR322mpt4, гидролизовали эндонуклеазами *EcoRI* и *BspI*, после чего вводили ^{32}P -метку, достраивая *EcoRI*-концы при помощи ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ и dTTP . Образовавшийся радиоактивный фрагмент длиной около 90 пар оснований (п.о.) выделяли электрофорезом в 5% ПАГ и анализировали модифицированным методом Максама — Гилберта. В результате была определена 76-нуклеотидная последовательность, большая часть которой (начиная с 3'-конца) представляет собой синтетический 61-членный нуклеотид (XVI), а остальная совпадает с опубликованной последовательностью нижней цепи pBR322 между сайтами *VamHI* и *HaeIII* в положении 402 [3].

Второй промоторный вектор был нами сконструирован на основе рекомбинантной плазмиды pBR322mpt5/*KpnI/T7PA1*, которая содержит ранний промотор A1 фага T7, фланкированный *KpnI*-сайтами [4]. Для конструирования этого вектора был использован *KpnI/VamHI*-фрагмент ДНК с нуклеотидной последовательностью Шайна — Дальгарно, синтезированный следующим образом (рис. 2).

Лигированием четырех упоминавшихся выше олигонуклеотидов $[(\text{VII}) + (\text{pIX})] \cdot [(\text{pVIII}) + (\text{X})]$ был получен 26-членный дуплекс (XIII) · (XVII), который фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GATP}$ и затем гидролизовали нуклеазой *KpnI*. Продукты гидролиза разделяли в 20% денатурирующем ПАГ и выделенный 5'-меченый эйкозануклеотид (XVIII) (его структура была доказана прямым определением нуклеотидной последовательности) гибридизовали с исходным додекануклеотидом (pIX).

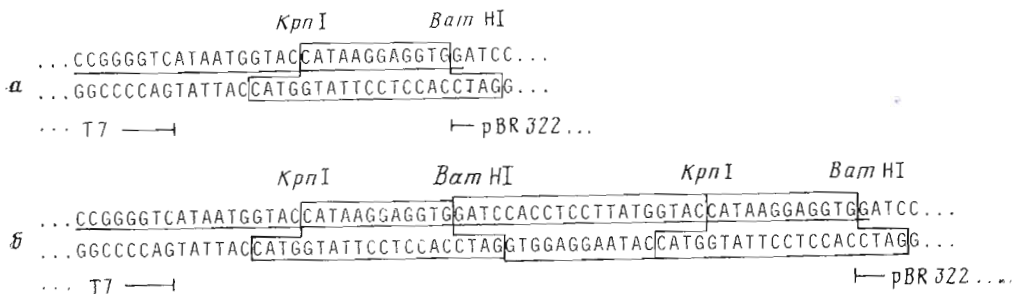


Рис. 3. Частичная структура рекомбинантных плазмид с промотором A1 фага T7 и синтетическим участком связывания рибосомы. а — плазида pSC26, б — плазида pSC27. Подчеркнуты нуклеотидные последовательности, экспериментально установленные в настоящей работе. В рамки заключены вставки синтетических дуплексов

Образовавшийся дуплекс (pIX) · (pXVIII) лигировали с плазмидой pBR322mpt5/*Kpn*I/T7PA1, которая предварительно была исчерпывающе гидролизована нуклеазой *Bam*HI и частично нуклеазой *Kpn*I. Полученным веществом трансформировали *E. coli* HB101, трансформанты выращивали в присутствии ампициллина и тестировали на чувствительность к тетрациклину. Из Ar^rTc^s-колоний выделяли плазмидную ДНК, расщепляли нуклеазой *Kpn*I и гидролизат анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле. Плазмиды, образующие *Kpn*I-фрагмент длиной около 300 п.о., подвергали дальнейшему анализу. Для этого их разрезали рестриктазой *Bam*HI, 3'-концы достраивали ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) с [α -³²P]dGTP и dATP, меченую ДНК гидролизовали нуклеазой *Eco*RI и радиоактивные фрагменты разделяли электрофорезом в 5% ПАГ.

В одной из плазмид, обозначенной pSC26, был обнаружен *Eco*RI/*Bam*HI-фрагмент длиной приблизительно 320 п.о., при секвенировании которого (от 3'-конца верхней цепи) установлена нуклеотидная последовательность, приведенная на рис. 3а. Из другой плазмиды, pSC27, наряду с этим фрагментом образовался еще один, длиной 32 п.о.; определение его нуклеотидной последовательности показало, что он представляет собой димер исходного дуплекса (pIX) · (pXVIII) с *Kpn*I-сайтом в центре молекулы. Отсюда следует, что эта плазида имеет структуру, изображенную на рис. 3б, и содержит 2n+1 синтетических вставок (вероятно, n=1).

Таким образом, нами получены плазмидные векторы, в которых синтетический участок связывания рибосомы сочленен с искусственным или природным промотором и ограничен уникальным рестриктивным сайтом. Применение одного из этих векторов для конструирования полностью синтетических искусственных генов описано в сообщении [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Синтез промоторных линкеров для экспрессии генов в *E. coli*. — Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1740–1742.
2. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Колосов М. Н. Химико-ферментативный синтез модельного промотора транскрипции и участка узнавания РНК-полимеразы *Escherichia coli*. — Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 783–785.
3. Sutcliffe J. G. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. — Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77–90.
4. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Чувило С. А., Северцова И. В., Шингарова Л. Н., Колосов М. Н. Плазмидный вектор для клонирования промоторов. — Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 309–312.
5. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Власов В. П., Колосов М. Н. Полностью синтетические искусственные гены брадикинина и пептида сна. — Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1881–1884.

Поступило в редакцию
17.VII.1981

PROMOTER CONTAINING VECTORS WITH A SYNTHETIC RIBOSOME BINDING SITE

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., CHUVPILO S. A.,
SEVERTSOVA I. V., KOLOSOV M. N.

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

Ten deoxyoligonucleotides chemically synthesized by the phosphotriester method were stepwise ligated into a 61-membered DNA (Fig. 1) that included the model transcriptional promoter of Scherer et al. and a 10 nucleotide sequence of Shine and Dalgarno (SD). The DNA was substituted for the minor *EcoRI/BamHI* fragment of plasmid pBR322 to obtain a vector (pBR322mpt4) that contained the artificial promoter upstream and the unique *BamHI* site immediately downstream from the synthetic SD sequence. For another vector construction, a *KpnI/BamHI* terminated duplex ((pIX)-(pXVIII), Fig. 2) was prepared by ligation of four synthetic deoxyoligonucleotides followed by hydrolysis with restriction nuclease *KpnI*. The duplex was ligated with a recombinant plasmid pBR322mpt5/*KpnI*/T7PA1 which had been digested completely with nuclease *BamHI* and partially with *KpnI*. On cloning in *E. coli* HB101, two recombinant plasmids were isolated (pSC26 and pSC27, Fig. 3) containing an odd number of synthetic ribosome binding sites preceded by the A1 promoter of phage T7 and followed by the *BamHI* restriction site.