



УДК 547.963.32.02:577.159.02

ТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ  
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* С ПЛАЗМИДОЙ pBR 322  
В ОБЛАСТИ АМПИЦИЛЛИНОВОГО И ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО  
ПРОМОТОРОВ

*Микрюков Н. А., Каргинов В. А.*

Всесоюзный научно-исследовательский институт  
молекулярной биологии, Новосибирск

*Василенко С. К.*

Институт органической химии Академии наук СССР  
Сибирского отделения, Новосибирск

Предполагается, что в плазмиде pBR 322 [1] транскрипция генов, определяющих устойчивость к тетрациклину и ампициллину, инициируется с промоторов  $P_{Tc}$  и  $P_{Ap}$  соответственно. Результаты работ [2, 3] позволили картировать фрагменты рестрикции, содержащие эти промоторы. Нами точно локализованы участки связывания РНК-полимеразы *E. coli* (КФ 2.7.7.6) с промоторами  $P_{Tc}$  и  $P_{Ap}$  плазмиды pBR 322 методом «футпринтирования» [4]. Этот метод позволяет определить область, защищаемую белком от действия нуклеазы, с точностью до одного нуклеотида.

Для локализации участка связывания РНК-полимеразы в области  $P_{Tc}$  использовали фрагмент *MspI/Sau* 3A-480, образующийся при расщеплении ДНК pBR 322 эндонуклеазами рестрикции *MspI* и *Sau* 3A (480 нуклеотидных пар) и содержащий 5'- или 3'-<sup>32</sup>P-метку по *Msp*-концу, в случае области  $P_{Ap}$  — фрагмент *EcoRI/MspI*-460 с меченным аналогичным образом *EcoRI*-концом (рис. 1). Введение 5'-концевой метки с помощью T4-полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78), 3'-концевой метки с использованием ДНК-полимеразы, гель-электрофорез и секвенирование ДНК проводили по методу [5] с применением модификаций, описанных ранее [6, 7]. «Футпринты» получали по методу [8]. Разделение продуктов частичного гидролиза осуществляли в пластинах 8% полиакриламидного геля размером 40×20×0,05 см.

На рис. 2 приведены нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК плазмиды pBR 322, содержащих соответствующие промоторные области с указанием для обеих цепей участков, защищаемых РНК-полимеразой от действия ДНКазы I (КФ 3.1.4.5). Следует отметить, что взаимодополнительные цепи ДНК в районе одного и того же промотора защищаются в различной степени. Кроме того, наши эксперименты показали, что размер области, экранируемой РНК-полимеразой, незначительно варьирует в зависимости от препарата фермента (на рис. 2 указаны максимальные размеры защищаемой области). Аналогичные особенности отмечены в работе [8] для промотора *lacUV 5*.

Полученные в нашей работе результаты подтверждают данные Родригеса и др. [2] о том, что связывание ДНК pBR 322 с РНК-полимеразой приводит к частичному ослаблению гидролиза эндонуклеазой рестрикции *EcoRI* и полной защите от действия рестриктазы *HindIII*. Из рис. 2 следует, что участок узнавания *HindIII* расположен в зоне, экранируемой РНК-полимеразой, а *EcoRI*-сайт — в пограничной с этой зоной области. Это может обуславливать стерические препятствия при взаимодействии

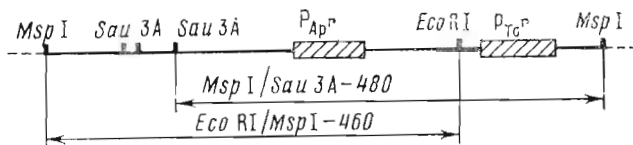


Рис. 1. Рестрикционная карта плазмиды pBR 322 в области промоторов  $P_{Tc}^r$  и  $P_{Amp}^r$

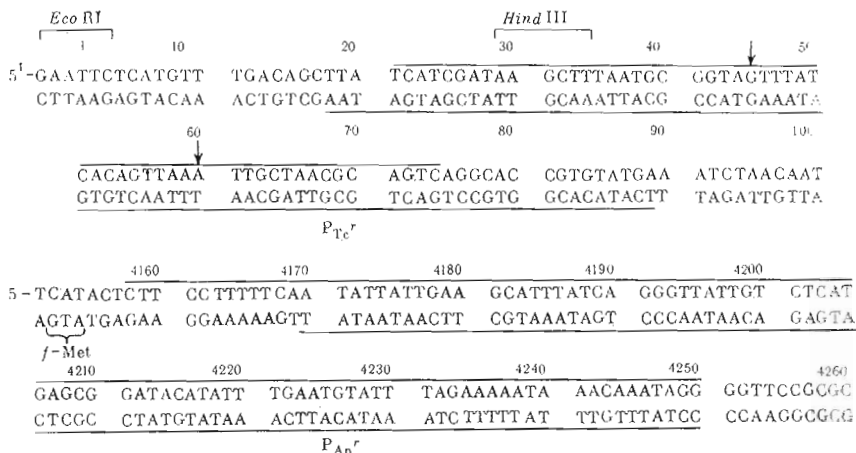


Рис. 2. Первичная структура плазмиды pBR 322 в области промоторов  $P_{Tc}^r$  и  $P_{Amp}^r$ . Нумерация нуклеотидных пар по Сатклифу [9]. Сплошной линией отмечены районы, защищаемые РНК-полимеразой от действия ДНКазы I. Стрелками указаны возможные точки инициации транскрипции

рестриктазы *EcoRI* с комплексом ДНК-РНК-полимераза, приводящие к уменьшению степени гидролиза ДНК по соответствующему сайту.

Наши результаты совпадают с известными данными [10, 11] о том, что возможные точки инициации транскрипции с промотора  $P_{Tc}^r$  пахотятся в области, защищаемой РНК-полимеразой (рис. 2). Место посадки РНК-полимеразы на фрагменте *EcoRI/MspI*-460 расположено в нескольких нуклеотидах от указанного в работе [9] иницирующего кодона для белка, обеспечивающего устойчивость к ампициллину. Таким образом, нами точно локализованы участки связывания РНК-полимеразы с промоторами  $P_{Tc}^r$  и  $P_{Amp}^r$ .

Авторы приносят благодарность В. Г. Коробко (ИБХ АН СССР, Москва) и М. И. Ривкину (Институт цитологии и генетики, Новосибирск) за препараты щелочной фосфатазы *E. coli* (КФ 3.1.3.1) и Т4-полинуклеотидкиназы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L., Boyer H. W. *Gene*, 1977, v. 2, № 1, p. 95-113.
2. Rodriguez R. L., West R. W., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 10, p. 3267-3287.
3. West R. W., Jr. Rodriguez R. L. *Gene*, 1980, v. 9, № 3-4, p. 175-193.
4. Galas D., Schmitz A. *Nucl. Acids Res.*, 1978, v. 5, № 9, p. 3157-3170.
5. Maxam A. M., Gilbert W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
6. Коробко В. Г., Грачев С. А. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1420-1422.
7. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 9, с. 1281-1283.
8. Smiltz A., Galas D. J. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 1, p. 111-137.
9. Sutcliffe J. G. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. Cold Spring Harbor.*, 1979, v. 43, part I, p. 77-90.
10. Rosenberg M., Court D. *Ann. Rev. Genet.*, 1979, v. 13, p. 319-353.

11. Бойер Г., Беллах М., Боливар Ф., Родригес Р., Хейнекер Г., Шайн Д., Гудман Г.  
В кн.: Рекомбинантные молекулы: значение для науки и практики. М.: Мир,  
1980, с. 20-34.

Поступило в редакцию  
11.VIII.1984

**PRECISE LOCALIZATION OF THE *E. COLI* RNA POLYMERASE BINDING SITES  
IN THE REGION OF AMPICILLIN AND TETRACYCLINE RESISTANCE PROMOTER  
OF THE pBR 322 PLASMID**

**MIKRYUKOV N. A., KARGINOV V. A., VASILENKO S. K.**

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Novosibirsk;  
Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Using DNase I footprinting method, two *E. coli* RNA polymerase binding sites in the region of ampicillin and tetracycline resistance promoters of the pBR 322 plasmid have been precisely localized.