



УДК 577(214.625+217.52):577.113.6

ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР С КОНТРОЛИРУЕМОЙ ТЕМПЕРАТУРОЙ
ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ

Кравченко В. В., Ямщиков В. Ф.*, Плетьнев А. Г.*

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской области;Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск

В плазмиде pBR327 осуществлена делеция фрагмента длиной 169 п. о., включающего в себя промотор p_{λ} гена *bla*. Полученная делеционная производная (pSP2) была использована для конструирования рекомбинантной плазмиды, несущей фрагмент ДНК фага λ с промотором p_R и геном термочувствительного репрессора *cI*. Показано, что в сконструированном плазмидном векторе (pSE119) с промотора p_R осуществляется контролируемая репрессором *cI* транскрипция гена *bla*, в результате чего часовая индукция при 42°С приводит к почти 100-кратному увеличению количества продукта гена *bla* по сравнению с таковым при 32°С. Возможность применения плазмиды pSE119 для экспрессии других генов продемонстрирована на примере полусинтетического гена β -галактозидазы *E. coli*. В этом случае при 3-часовой индукции клеток с рекомбинантной плазмидой pSEZ12 при 42°С наблюдается 300-кратное увеличение количества активной β -галактозидазы по сравнению с таковым при 32°С. Важно отметить, что в этих условиях (при 42°С) по крайней мере 99% клеток, содержащих плазмиду, сохраняют фенотип *lacZ*⁺, что свидетельствует о стабильности предлагаемой векторной системы.

Необходимой предпосылкой структурно-функциональных исследований в области молекулярной биологии и биоорганической химии является выделение индивидуальных генов и их продуктов. В настоящее время в принципе решены методические вопросы клонирования и экспрессии фрагментов ДНК с помощью различных векторов для получения препаративных количеств нуклеотидного или белкового материала. Однако часто оказывается, что высокий уровень синтеза продукта гена сопровождается низкой стабильностью белка или его токсичностью, приводящей к гибели клеток [1, 2]. Преодолеть эти трудности можно, в частности, созданием векторных систем, в которых экспрессия клонируемого гена находится под строгим контролем по принципу «включено-выключено». Такая система в режиме «выключено» позволяет вначале амплифицировать генетический материал, а затем в оптимальных условиях «включить» синтез его продукта.

Примером использования таких систем является применение векторов с индуцибельными промоторами типа p_{lacUV5} [3] или p_L [1, 4], «включение» которых осуществляется либо добавлением индуктора, либо повышением температуры (за счет инактивации репрессоров). Недостатком описанных систем является необходимость использования специальных штаммов *E. coli*, которые обеспечивают синтез определенного репрессора.

В работе [2] сообщалось о векторе на основе плазмиды pBR322 и фрагмента ДНК бактериофага λ , содержащего промотор правого оперона p_R и ген термочувствительного репрессора *cI*, который осуществляет негативный контроль транскрипции с этого промотора. Такой вектор лишен недостатков, отмеченных выше для систем на основе промоторов p_{lacUV5} и p_L , поскольку ген репрессора находится в составе плазмиды-вектора, который можно переносить в любые подходящие клетки *E. coli*. Однако для данного вектора обнаружена большая нестабильность, выражающаяся в 95% утрате плазмидой исходного фенотипа. Причиной такой нестабильности рекомбинантной плазмиды может быть наличие в ней [2] гена *gor*, который осуществляет негативный контроль репликации в плазмиде pBR322

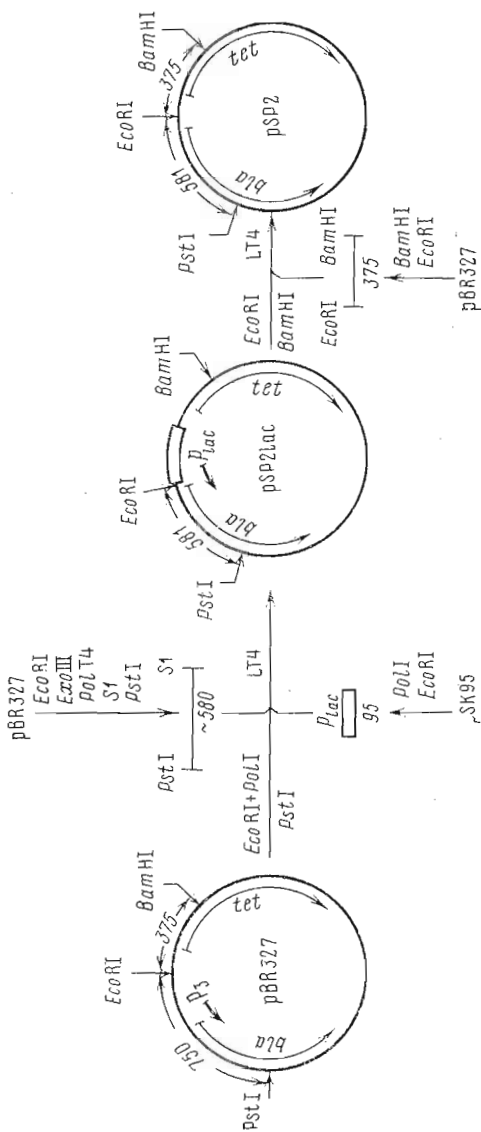


Рис. 1. Схема получения плазмид pSP2lac и pSP2. *Eco*RI, *Pst*I, *Bam*HI — расщепление соответствующей рестриктазой; *Eco*III — обработка экзонуклеазой III *E. coli*; *Pol*I и *Pol*IV — обработка ДНК-полимеразами I *E. coli* и флага T4 соответственно; S1 — расщепление нуклеазой S1; LT4 — сшивка ДНК-лигазой флага T4 и трансформация клеток *E. coli*. Цифры обозначают длины фрагментов в парях оснований. Длинные стрелки показывают положение и ориентацию генов *bla* и *tet* в плаزمиде, короткие — направления транскрипции с промоторов *p*₃ и *p*_{lac-uv5} (на рисунке для краткости — *p*_{lac}). Физические карты плазмид pSK95 и pBR327 описаны в работах [7, 14]

4193 1



Рис. 2. Нуклеотидная последовательность плазмиды pSP2 в районе начала гена *bla*. Сверху подчеркнута исследованная область сайта расщепления *Eco*RI. снизу — АТГ-кодон, с которого начинается транскрипция гена *bla*. Стрелкой указан старт транскрипции с промотора *p*₃ [9]. Точками отмечены первый и последний нуклеотидные остатки в плазмиде pSP2 по карте pBR322 [10]

[5, 6]. В плаزمидах этого типа ситуация осложняется еще тем, что в них промотор p_R ориентирован по направлению транскрипции гена *rop*, чем обеспечивается повышенный уровень синтеза белка *rop*. Известно, что в тех случаях, когда перед геном *rop* расположен сильный промотор, число копий плазмиды снижается и вся конструкция становится нестабильной [6].

В связи с этим представляло интерес создание и исследование свойств векторной плазмиды на основе промотора p_R и гена репрессора *cI*, лишенной указанных выше недостатков. Для клонирования промотора p_R и гена *cI* была выбрана плаزمида pBR327 [7]. В отличие от pBR322 [8] в ней делетирован участок длиной ~1100 п.о. из области, прилегающей к району инициации репликации [7]. Согласно данным работ [5, 6], делеция этого участка приводит к утрате гена *rop*.

Главным принципом конструирования вектора было создание искусственного оперона, в котором последовательно расположены: 1) промотор (в данном случае p_R) и его регулятор (ген репрессора *cI*); 2) ген белка, который необходимо экспрессировать; 3) ген-маркер, который обеспечивает селективный признак.

В качестве маркерного гена был выбран плазмидный ген, обеспечивающий клеткам устойчивость к ампициллину (ген *bla*). Для того чтобы поставить ген *bla* под контроль p_R , необходимо было удалить его собственный промотор p_3 (рис. 1), старт транскрипции с которого находится в точке 4189* [9]. Стадии удаления промотора p_3 из ДНК pBR327 показаны на рис. 1.

На первой стадии линейаризованную рестриктазой *EcoRI* плазмиду pBR327 обрабатывали экзонуклеазой III в условиях, описанных в работе [12]. Для получения набора молекул, несущих на 3'-концах остаток дезоксигуанозина, ДНК инкубировали с эквивалентным количеством (в расчете на концы линейаризованной плазмиды) ДНК-полимеразы фага T4 в присутствии избытка dGTP, а выступающие 5'-концы удаляли гидролизом нуклеазой S1. Подготовленную таким образом ДНК расщепляли рестриктазой *PstI* и выделяли набор фрагментов длиной ~580 п.о. электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ). Полученная смесь фрагментов была лигирована вместе с *EcoRI*-фрагментом длиной 95 п.о., выделенным из плазмиды pSK95 (см. рис. 1 и «Экспериментальную часть») и *PstI/EcoRI*-векторной частью плазмиды pBR327 (см. рис. 1). Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* C600, отбирая клоны с фенотипом Ap^r , Tc^r и с ярко-голубой окраской в присутствии 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозида (X-gal). Из колоний с таким фенотипом выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее на наличие сайта *EcoRI*, который должен возникать на стыке при лигировании фрагмента 580 п.о., укороченного до 3'-концевого остатка гуанозина, с *EcoRI*-фрагментом длиной 95 п.о. из pSK95, достроенного с помощью dATP и dTTP в присутствии ДНК-полимеразы I из *E. coli*. Затем с помощью рестрикционного анализа рестриктазами *EcoRI* и *Sau3A* была отобрана плаزمида pSP2lac (см. рис. 1), имеющая максимальную делецию (~170 п.о.). После замены рекомбинацией *in vitro* в плазмиде pSP2lac *EcoRI/BamHI*-фрагмента, содержащего промотор p_{lacUV5} и часть гена *tet*, на соответствующий фрагмент из pBR327 была получена плазмида pSP2 (см. рис. 1). Определение нуклеотидной последовательности этой плазмиды вблизи сайта *EcoRI* показало (рис. 2), что делеция составляет 169 п.о., начиная с позиции 4193 вплоть до участка расщепления *EcoRI*.

По литературным данным [9], старт транскрипции с промотора p_3 находится в точке 4189. Значит, делеция 169 п.о. в ДНК pSP2 (см. рис. 2) удаляет этот промотор, поскольку известно [11], что для инициации транскрипции РНК-полимеразой *E. coli* необходима специфическая последовательность ДНК, расположенная в пределах 40–50 п.о. перед точкой

* Первичная структура ДНК pBR327 однозначно выводится из способа ее конструирования [7] на основе данных о структуре ДНК pBR322 [10]. Поэтому здесь и далее координаты нуклеотидных остатков плазмиды pBR327 даны по карте pBR322 [10].

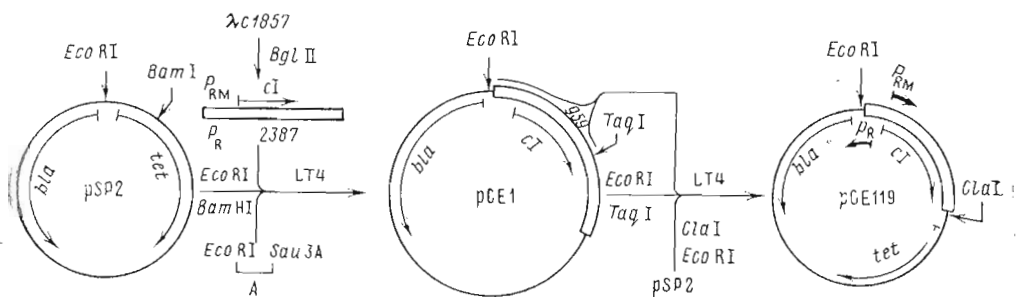


Рис. 3. Схема получения плазмид pCE1 и pCE119. Длина *Bgl*II-фрагмента ДНК λ c1857ind⁻, содержащего блок *p_R-cI* с промотором *p_{RM}*, помечена по [13]. А — химически синтезированный адаптер, состоящий из двух комплементарных олигонуклеотидов (5'ААТТСТАТГТГТ3' и 5'ГАТСАСАТАГ3') с 5'-выступающими концами для клонирования по сайтам *Bam*HI или *Bgl*II и *Eco*RI (при этом сайты *Bam*HI и *Bgl*II не восстанавливаются, а остается только сайт расщепления рестриктазой *Sau*3A). Другие обозначения такие же, как в подписи к рис. 1

старта РНК. Однако клетки *E. coli*, содержащие плазмиду pSP2, устойчивы к ампициллину. По-видимому, это связано с тем, что транскрипция гена *bla* осуществляется в плазмиде с промотора *p_i*, расположенного справа от *Hind*III-сайта [9].

Таким образом, получена плаزمида pSP2, содержащая ген *bla* с сигналами инициации трансляции, но лишенная собственного промотора *p₃*. Эта плазмида пригодна для клонирования промоторсодержащих фрагментов, причем конструкция позволяет вести непосредственный отбор рекомбинантов за счет специфичной активности гена *bla*.

Такие возможности плазмиды pSP2 были проверены на примере клонирования промотора *p_R* вместе с геном репрессора *cI*. На основании полной первичной структуры ДНК фага λ c1857ind⁻ блок *p_R-cI* фланкирован сайтами расщепления рестриктаз *Bgl*II (позиция 38103) и *Taq*I (позиция 37169) [13]. Выделить этот фрагмент непосредственно из *Bgl*II/*Taq*I-гидролизата ДНК λ c1857ind⁻ практически невозможно. Поэтому было предпринято клонирование *Bgl*II-фрагмента (2387 п.о.), содержащего блок *p_R-cI* вместе с генами *rexA* и *rexB* [13], в *Eco*RI/*Bam*HI-векторной части плазмиды pSP2 (рис. 3). Чтобы обеспечить нужную ориентацию промотора *p_R* по отношению к гену *bla*, использовали синтетический адаптер *Eco*RI/*Sau*3A, структура которого приведена в подписи к рис. 3. Использование адаптера позволило ввести терминирующий кодон, обрывающий трансляцию части гена *cro*, который присутствует во фрагменте *Bgl*II (2387 п.о., см. рис. 3 и [13]). Отбор трансформантов вели непосредственно на чашках с ампициллином, чтобы отсеять рекомбинанты с противоположной ориентацией фрагмента относительно гена *bla*. Поскольку заранее не было ясно, как поведет себя блок *p_R-cI* при клонировании, трансформанты выращивали при 32 и 37°С. На чашках с ампициллином, инкубированных при 32°С, не было найдено ни одной колонии, а на чашках, инкубированных при 37°С, все колонии с фенотипом *Ap^r* содержали плазмиду с фрагментом в нужной ориентации (см. плазмиду pCE1 на рис. 3). Из плазмиды pCE1 совместным гидролизом рестриктазами *Eco*RI и *Taq*I был получен фрагмент размером 959 п.о., содержащий блок *p_R-cI*, и его клонировали в плазмиде pSP2 по сайтам *Eco*RI и *Cla*I (рис. 3). Отбор трансформантов вели на чашках с ампициллином при 37°С. Анализ структуры плазмидных ДНК осуществляли с помощью рестриктаз *Eco*RI, *Hind*III и *Bsp*I (ниже приведены результаты *Bsp*I-анализа), из которых однозначно выводится физическая карта плазмиды pCE119 (см. рис. 3).

На основании данных работы [14] можно предполагать, что расщепление плазмиды pSP2 рестриктазой *Cla*I инактивирует промотор гена *tet*. С другой стороны, транскрипция гена *cI* с промотора *p_{RM}* продолжается в область генов *rexA* и *rexB* [2, 13], поэтому можно было ожидать, что в плазмиде pCE119 с промотора *p_{RM}* возможна транскрипция гена *tet* (см. рис. 3). Действительно, оказалось, что присутствие в клетках *E. coli* C600

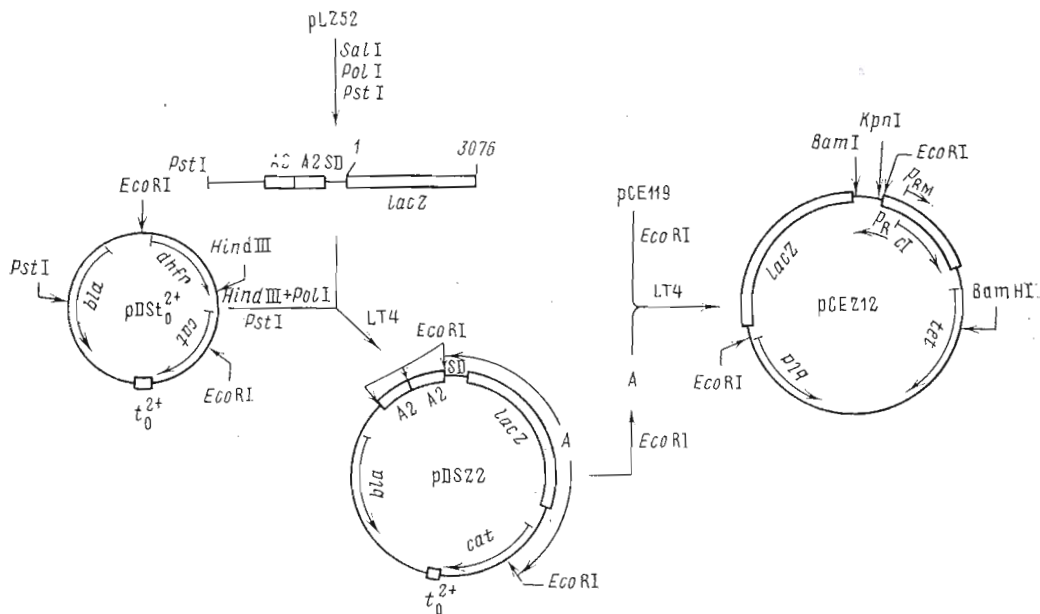


Рис. 4. Схема получения плазмид pDSZ2 и pCEZ12. Физические карты плазмид pDSt₀²⁺ и pLZ52 приведены по работам [5, 15] соответственно. t₀²⁺ — терминатор *oop*-РНК ДНК фага λ [5, 6]. Другие обозначения такие же, как в подписи к рис. 1, 3

этой плазмиды обеспечивает им устойчивость к низким концентрациям тетрациклина (10 мкг/мл). Параллельная проверка устойчивости клеток *E. coli* С600 без плазмиды показала, что рост клеток полностью прекращается при концентрации антибиотика 5 мкг/мл. Эти результаты подтверждают предположение, что с промотора *p_{RM}* происходит слабая транскрипция генов *cI* и *tet* в составе плазмиды pCE119. Известно [4], что клетки *E. coli*, содержащие функционально активный репрессор *cI*, иммунны к инфицированию фагом λ. Поэтому для проверки наличия в клетках *E. coli* (pCE119) функционально активного репрессора *cI* и доказательства его термочувствительности изучали способность фага λ размножаться на этих клетках при 32 и 42° С. Было найдено, что клетки *E. coli* (pCE119) иммунны к инфицированию фагом λ (использовали дикий тип λ⁺ и его мутант λ*cI857ind*⁻) при 32° С, но утрачивают такой иммунитет при 42° С. В противоположность этому клетки *E. coli* без плазмиды были одинаково чувствительны к инфицированию фагом при обеих температурах. Таким образом, можно заключить, что в клетках, содержащих плазмиду pCE119, синтезируется репрессор *cI*, функционально активный при 32° С и неактивный при 42° С.

На примере гена *bla* мы провели предварительную оценку применимости сконструированного вектора pCE119 для регулируемой экспрессии под контролем промотора *p_R* и репрессора *cI*. С этой целью сравнили уровень синтеза β-лактамазы в клетках, содержащих плазмиду pCE119, при 32 и 42° С. Было найдено, что при повышении температуры до 42° С количество β-лактамазы достигает максимума после 1-го ч инкубации в этих условиях.

Более подробное исследование терморегулируемой экспрессии генов в плазмиде pCE119 было проведено на примере полусинтетического гена β-галактозидазы *E. coli*, выделенного из плазмиды pLZ52 [15]. С целью получения гена *lacZ*, фланкированного сайтами расщепления рестриктазы *EcoRI*, из ДНК pLZ52 был выделен *PstI/SalI*-фрагмент, содержащий этот ген вместе с участком инициации трансляции [15], и перенесен в *PstI/HindIII*-векторную часть плазмиды pDSt₀²⁺ (рис. 4). Полученная

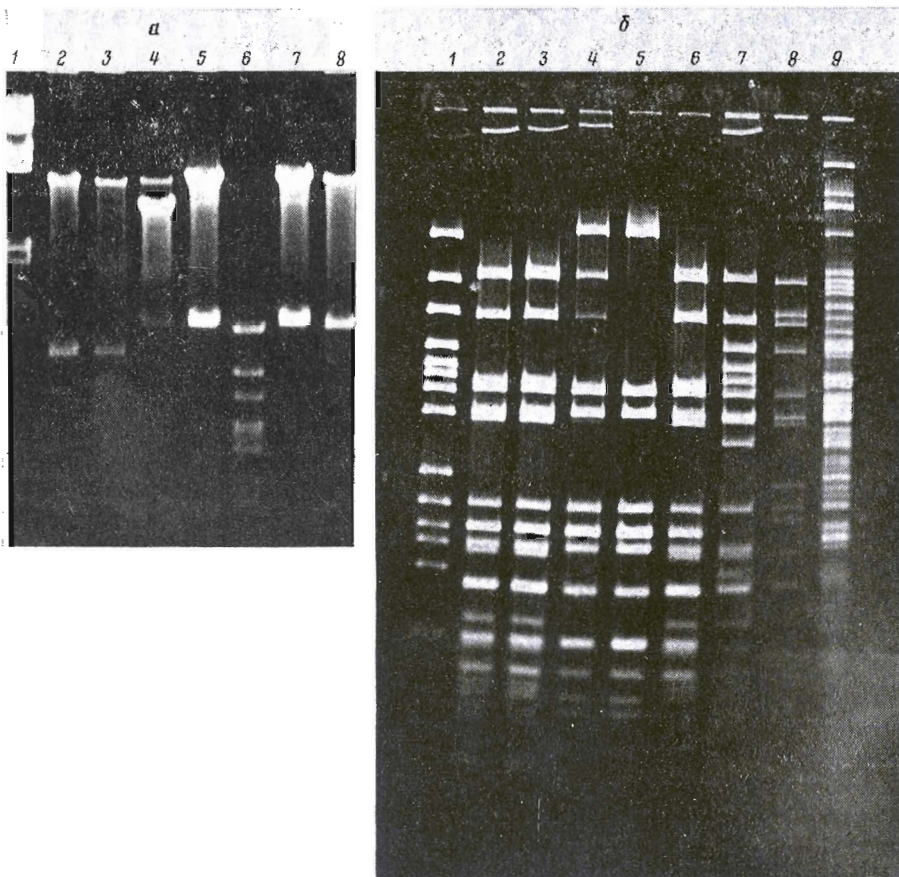


Рис. 5. Рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид. *а* – результаты электрофоретического разделения продуктов гидролиза ДНК в 1% АГ: 1 – ДНК λ c1857 ind^+ + *Hind*III; 2, 3 – ДНК pLZ3 после совместного гидролиза *Bam*HI и *Pst*I; 4, 5 и 7 – ДНК pCEZ10, pCEZ11 и pCEZ12 (соответственно) + *Bam*HI; 6 – ДНК pQ_Р + *Bsp*I; 8 – ДНК pCEZ12, выделенная после выращивания клеток в течение 3 ч при 42° С и гидролизованная рестриктазой *Bam*HI. *б* – результаты электрофоретического разделения продуктов гидролиза ДНК в 4% ПААГ: 1 – то же, что дорожка 6 на рис. 5а; 2, 4 и 6 – то же, что дорожки 4–6 (соответственно) на рис. 5а, но гидролизованы рестриктазой *Bsp*I; 3 – то же, что дорожка 8 на рис. 5а, но + *Bsp*I; 5 – ДНК pCE119 + *Bsp*I; 7 – ДНК pLZ3 + *Bsp*I; 8 – ДНК pDSZ2 + *Bsp*I; 9 – ДНК λ c1857 ind^- + *Bsp*I. Длины фрагментов-маркеров (*Bsp*I-фрагменты ДНК плазмиды pQ_Р, *Hind*III- и *Bsp*I-фрагменты ДНК λ c1857 ind^-) определены по [17, 13] соответственно. Условия электрофореза см. «Экспер. часть»

в результате плазида pDSZ2 содержала ген *lacZ*, фланкированный сайтами расщепления рестриктазы *Eco*RI. Эта плазида была охарактеризована рестрикционным анализом с помощью эндонуклеазы *Bsp*I (рис. 5). Из ДНК pDSZ2 был выделен *Eco*RI-фрагмент, содержащий ген *lacZ*, и реклонирован по сайту *Eco*RI в плазмиде pCE119 (см. рис. 4). Трансформацию клеток *E. coli* CSH36 и отбор рекомбинантов проводили при 37° С на чашках с ампициллином и X-gal. Анализ плазмидных ДНК, приготовленных из интенсивно-синих колоний (наблюдали только ярко-синие и белые колонии), с помощью рестриктаз *Bam*HI и *Bsp*I (рис. 5) позволил отобрать плазмиды с пужной ориентацией гена *lacZ* относительно промотора *p_Р*. Один из клонов, содержащий такую плазмиду (обозначена pCEZ12, см. рис. 4), использовался для дальнейших экспериментов.

Для определения уровня синтеза β -галактозидазы клетки *E. coli* CSH36 (pCEZ12) выращивали при 32° С до плотности $\sim 0,3$ ОЕ₅₅₀/мл, а затем инкубировали при этой же температуре или 42° С, отбирая с часовым интервалом времени алиquotы клеточной суспензии для анализа. Аналогично были приготовлены для анализа клетки *E. coli* CSH36, несущие плазмиду

Результаты определения активности β -галактозидазы в клетках *E. coli* CSH36, несущих плазмиды pLZ3 и pCEZ12

Номер пробы	Плаزمида	Температура выращивания, °C	Время роста, ч	Поглощение при 550 нм	Аликвота клеток для анализа, мкл	Поглощение реакционной смеси при 420 нм	Активность β -галактозидазы *	
1	pLZ3	32	0	0,44	100	0,15	340	
2			1	0,84	100	0,21	250	
3			2	1,73	100	0,49	270	
4			3	2,26	100	0,79	340	
5			42	1	1,45	100	0,31	200
6				2	2,01	100	0,63	310
7				3	2,31	100	1,31	550
8	pCEZ12	32	0	0,37	100	0,08	—	
9			1	0,89	100	0,09	—	
10			2	1,81	100	0,17	95	
11			3	2,28	100	0,25	110	
12			42	1	1,35	10	0,96	7100
13				2	1,89	2	0,62	16 400
14				3	2,19	1	0,72	32 700

* Использoваны условные единицы активности, рассчитанные как описано в работе [16].

pLZ3, в которой транскрипция гена *lacZ* находится под контролем промотора AI фага T7 [15]. Результаты этих экспериментов (таблица) свидетельствуют о том, что уровень синтеза β -галактозидазы в случае плазмиды pLZ3 практически одинаков при 32 и 42° C и составляет в среднем 300 ед. акт. В случае плазмиды pCEZ12 при 32° C эта величина близка к фону (фоновым считали уровень синтеза β -галактозидазы в клетках CSH36, несущих плазмиду pLZ4, в которой ген *lacZ* клонирован без промотора [15]). С другой стороны, при 42° C наблюдается резкое увеличение синтеза продукта гена *lacZ*, который к 3 ч инкубации при этой температуре достигает величины 32 700 ед. акт., что в 60 раз выше, чем в случае конститутивного синтеза (плаزمида pLZ3), и более чем в 300 раз выше по

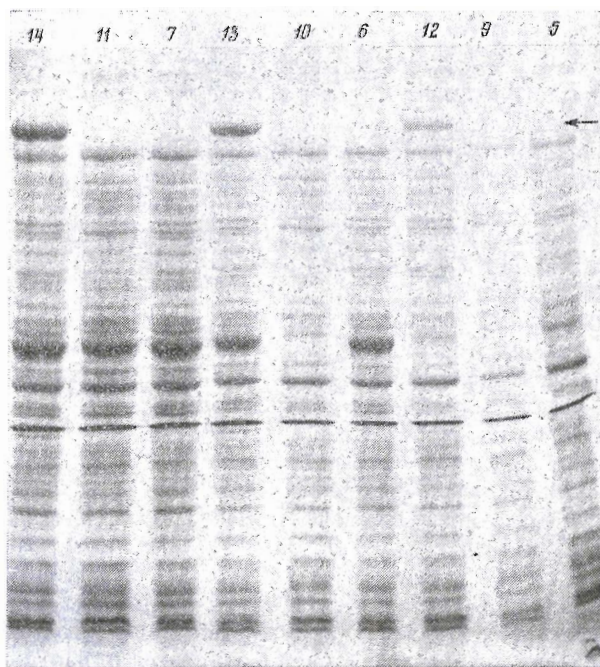


Рис. 6. Результаты электрофоретического разделения клеточных лизатов в 7,5% ПААГ. Дорожки помечены номерами соответствующих проб, указанных в таблице. Приготовление материала для анализа и условия электрофореза см. в «Экспер. части». Положение β -галактозидазы указано стрелкой

сравнению с результатами инкубации этих же клеток при 32° С (см. таблицу). Параллельно с определением активности β-галактозидазы пробы анализировали электрофорезом в 7,5% ПААГ (рис. 6). Результаты этого анализа наглядно демонстрируют данные, представленные в таблице.

После 3 ч инкубации при 42° С аликвоту культуры клеток, несущих плазмиду pCEZ12, высевали на селективные чашки с ампициллином и X-gal, а из оставшейся части выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее с помощью рестриктаз *Bam*HI и *Bsp*I (см. рис. 5). Результаты экспериментов показали стабильность плазмиды в этих условиях выращивания, поскольку среди более чем 10³ трансформантов не было найдено колоний с фенотипом *lacZ*⁻, а выделенная ДНК была идентична по набору *Bsp*I-фрагментов исходной плазмиде (рис. 5).

Таким образом, нами сконструированы векторные плазмиды pCE119 и pCEZ12, позволяющие получать высокий, регулируемый температурой уровень экспрессии клонированных в них генов, без существенных изменений в рекомбинантной плазмиде, которые наблюдались в случае использования векторов, описанных в работах [1, 2].

Экспериментальная часть

В работе использовали штаммы *E. coli* C600 (*F*⁻, *leu*, *thr*, *thi*, *lacY*, *supE*) и CSH36 (*F*⁻, Δ(*lac*, *pro*) *supE*, *thi*), бактериофаги λ⁺ и λ*cI857ind*⁻ и плазмиды pDSt₀²⁺ [5], pBR327 [7], pLZ3 и pLZ52 [15], pSK95 [11] и pQpR^r [17]. Выращивание клеток *E. coli* осуществляли на LB-среде, содержащей в случае плазмидных штаммов антибиотик ампициллин (50 мкг/мл), тетрациклин (5–20 мкг/мл) и хлорамфеникол (30 мкг/мл) по отдельности и в комбинации, в зависимости от типа плазмиды. Селекцию бактериальных клонов проводили на LB-чашках с антибиотиками, а в случае тестирования активности гена *lacZ* дополнительно добавляли до концентрации 40 мкг/мл X-gal (Serva, ФРГ).

Рестриктазы *Eco*RI, *Sau*3A, *Pst*I, *Bam*HI, *Taq*I были производства НИКТИ БАВ (Новосибирск). Рестриктазы *Bgl*II и *Cla*I любезно предоставлены С. А. Чувпило (ИБХ АН СССР), ДНК-полимераза I из *E. coli*, ДНК-полимераза фага T4, рестриктаза *Hind*III, нуклеазы S1 и *Exo*III — Ю. С. Нечаевым. Дезоксинуклеозид-5'-[α-³²P]трифосфаты — препараты фирмы Amersham (Англия). *Eco*RI/*Sau*3A-адаптер синтезирован и любезно предоставлен А. Н. Сияковым.

Все использованные в работе плазмиды были выделены по методу [18] с модификациями. Из препарата плазмиды полисахариды удаляли двукратным осаждением из 2,5 М ацетата натрия, pH 7,0. ДНК затем осаждали 2,5 объема этанола, обрабатывали РНКазой А (20 мкг/мл) 30 мин при 37° С в буфере TE [11] и фильтровали на колонке с сефарозой CL-2B.

Условия обработки ДНК различными ферментами при получении рекомбинантных плазмид *in vitro* и трансформации клеток *E. coli* плазмидами проводили как описано ранее [11], если не отмечено особо. Фрагменты ДНК выделяли электрофорезом в 4% ПААГ или 1% агарозном геле (АГ), согласно [11], с последующей электроолюцией на DEAE-бумагу [19]. Получение ³²P-меченых фрагментов ДНК и определение их нуклеотидной последовательности проводили так, как описано в работе [20].

Получение плазмиды pSP2. 20 мкг *Eco*RI-гидролизата ДНК pBR327 инкубировали 75 мин с 150 ед. акт. *Exo*III при 20° С в 240 мкл буфера, содержащего 78,5 мМ трис-HCl (pH 8,0), 7,5 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 72,5 мМ NaCl. Реакцию останавливали добавлением 60 мкл раствора А, содержащего 0,25 М EDTA и 1,5 М ацетат натрия, pH 8,0. Белок удаляли экстракцией 300 мкл фенола, насыщенного 0,1 М трис-HCl, pH 8,0. ДНК из водной фазы осаждали этанолом и растворяли в 80 мкл смеси 25 мМ трис-HCl (pH 8,5), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мМ dGTP. Реакционную смесь инкубировали 2 мин при 37° С с 20 пмоль (2,3 мкг) ДНК-полимеразы фага T4 и реакцию останавливали добавлением 20 мкл раствора А. После депротеинизации ДНК осаждали этанолом, растворяли в 100 мкл буфера для S1 [21] и обрабатывали

10 мин 10 ед. акт. нуклеазы S1 при 20° С. Фермент удаляли экстракцией фенолом, а ДНК гидролизovali рестриктазой *Pst*I. Набор фрагментов длиной ~580 п.о. из этого гидролизата выделяли электрофорезом в 4% ПААГ. Полученный набор фрагментов в смеси с 0,5 мкг фрагмента *Eco*RI-95 (выделен из плазмиды рSK95 [11] после достройки *Eco*RI-концов ДНК-полимеразой I в присутствии 100 мкМ dATP, dTTP, dGTP каждого) и с *Pst*I/*Eco*RI-векторной частью плазмиды рBR327 (*Eco*RI-конец достроен ДНК-полимеразой I, как указано выше) обрабатывали ДНК-лигазой фага T4. Реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* С600. Трансформанты отбирали на LB-чашках, содержащих ампициллин, тетрациклин и X-gal. ДНК из колоний анализировали с помощью рестриктаз *Eco*RI и *Sau*3A. В результате была отобрана плазида рSP2lac (см. рис. 1).

1 мкг *Eco*RI/*Bam*HI-векторной части плазмиды рSP2lac вместе с 0,5 мкг фрагмента *Eco*RI/*Bam*HI-375 (выделен из ДНК рBR327) обрабатывали ДНК-лигазой фага T4 и 1/10 этой смеси трансформировали клетки *E. coli* С600. Трансформанты отбирали на LB-чашках, содержащих тетрациклин. В результате рестрикционного анализа плазмид, выделенных из Tc^r-клонов, была отобрана плазида рSP2 (рис. 1). Первичную структуру ДНК рSP2 в районе делеции определяли после введения ³²P-метки во фрагмент *Hind*III/*Bsp*I.

Получение плазмиды рCEI. Из *Bgl*II-гидролизата ДНК фага λс1857ind⁻ выделяли фрагмент длиной 2387 п.о. с помощью электрофореза в 1% АГ. 0,5 мкг этого фрагмента в смеси с 1 мкг *Eco*RI/*Bam*HI-векторной части плазмиды рSP2 и с 40 пмоль *Eco*RI/*Sau*3A-адаптера (структуру адаптера см. в подписи к рис. 3) обрабатывали ДНК-лигазой фага T4. Реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* С600. Трансформанты отбирали на LB-чашках с ампициллином, которые инкубировали при 32 и 37° С. ДНК плазмид из отобранных клонов анализировали с помощью рестриктаз *Eco*RI, *Hind*III и *Taq*I. В результате анализа была отобрана плазида рCEI.

Получение плазмиды рCE119. 1 мкг *Eco*RI/*Cla*I-векторной части плазмиды рSP2 лигировали с 0,5 мкг фрагмента *Eco*RI/*Taq*I-959 (выделен из ДНК рCEI и содержит блок рR — cI) и 1/10 этой смеси трансформировали клетки *E. coli* С600. Трансформанты отбирали на LB-чашках с ампициллином и проверяли у них устойчивость к тетрациклину, высеивая отдельные колонии на селективные чашки с тетрациклином в концентрации 5, 10 и 20 мкг/мл. Из клонов, растущих при концентрации тетрациклина до 10 мкг/мл, готовили плазмидную ДНК, которую анализировали путем совместного гидролиза рестриктазами *Eco*RI и *Hind*III. В результате анализа была отобрана плазида рCE119 (см. рис. 3).

Получение плазмиды рDSZ2. Вектор готовили следующим образом. ДНК плазмиды рDSt₀²⁺ гидролизovali рестриктазами *Hind*III и *Pst*I, причем *Hind*III-конец достраивали ДНК-полимеразой I в присутствии четырех dNTP при концентрации каждого 100 мкМ с последующей очисткой в 1% АГ. Аналогично получали *Pst*I/*Sal*I-фрагмент плазмиды рLZ52 с достроенным ДНК-полимеразой I *Sal*I-концом. Смесью обоих фрагментов (по 0,5 мкг каждого) обрабатывали ДНК-лигазой фага T4 и использовали для трансформации клеток *E. coli* CSH36. Селекцию трансформантов проводили на LB-чашках, содержащих ампициллин, хлорамфеникол и X-gal. Из клонов ярко-синего цвета выделяли плазмидную ДНК и анализировали с помощью рестриктаз *Eco*RI, *Pst*I, *Bam*HI, *Kpn*I и *Bsp*I. В результате этих анализов была отобрана плазида рDSZ2 (см. рис. 4).

Получение плазмиды рCEZ12. ДНК плазмиды рCE119 гидролизovali рестриктазой *Eco*RI, фермент инактивировали прогреванием при 70° С в течение 5 мин, белок удаляли экстракцией смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1), ДНК осаждали спиртом и растворяли в буфере TE. Из *Eco*RI-гидролизата ДНК плазмиды рDSZ2 электрофорезом в 1% АГ выделяли фрагмент, содержащий ген *lacZ*. 1 мкг этого фрагмента лигировали с 1 мкг *Eco*RI-линеаризованной ДНК рCE119 и смесью трансформировали клетки *E. coli* CSH36. Селекцию трансформантов проводили на

LB-чашках, содержащих ампициллин и X-gal. Из ярко-голубых колоний выделяли плазмидную ДНК и анализировали с помощью рестриктаз *Bam*HI и *Bsp*I. На основании данных рестрикционного анализа была отобрана плаزمида pCEZ12 (рис. 4).

Анализ продуктов, кодируемых плазмидами. а) *Тест на иммунитет к фагу λ.* Фаг λ титровали как описано в работе [16]. Титр фагов λ⁺ и λC1857ind⁻ определяли, используя штамм *E. coli* C600 с плазмидой pCE119 и без нее. Инкубацию индикаторных чашек после высева инфицированных фагом клеток проводили при 32 и 42° С.

б) *Определение активности β-лактамазы.* Клетки *E. coli* C600, содержащие плазмиду pCE119, выращивали в LB-бульоне при 32° С до поглощения 1 ОЕ₅₅₀/мл. Отбирали 2 мл клеточной суспензии (нулевая точка), колбу переносили на качалку и продолжали выращивание клеток при 42° С, отбирая с часовым интервалом времени по 2 мл суспензии для анализа. Непосредственно после отбора пробы охлаждали во льду, клетки собирали центрифугированием (6000 об/мин, 0° С, 10 мин) и ресуспендировали в 2 мл 200 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5. Клетки разрушали ультразвуком при 22 кГц и клеточные остатки удаляли центрифугированием (8000 об/мин, 0° С, 10 мин). Аликвоту супернатанта использовали для определения активности β-лактамазы по методу [22]. Было найдено следующее количество единиц активности β-лактамазы (нормированных на 1 ОЕ₅₅₀ клеточной суспензии): 32° С — 20 (1 ч); 42° С — 1700 (1 ч); 1400 (2 ч).

в) *Определение активности β-галактозидазы.* Клетки *E. coli* CSH36, содержащие плазмиду pCEZ12 или pLZ3, выращивали в LB-среде с ампициллином до поглощения 0,3 ОЕ₅₅₀/мл при 32° С, переносили на качалку с температурой 42° С и продолжали выращивание еще 3 ч. Одновременно эту же культуру выращивали при 32° С. С часовым интервалом времени отбирали аликвоты клеточной суспензии для определения активности β-галактозидазы и для электрофоретического анализа. Активность β-галактозидазы определяли по скорости гидролиза *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды, как описано в работе [16]. Для приготовления электрофоретических проб клетки из 1 мл культуры собирали центрифугированием (6000 об/мин, 0° С, 10 мин), подсушивали и ресуспендировали в 100 мкл буфера (5% глицерин, 3% додецилсульфат натрия, 2% 2-меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий). Пробу выдерживали 10 мин при 100° С и 10 мкл наносили на 7,5% ПААГ. Электрофорез проводили согласно [5].

По окончании эксперимента аликвоту клеток, выращенных в течение 3 ч при 42° С и содержащих плазмиду pCEZ12, высевали на LB-чашки с ампициллином и X-gal, которые инкубировали 1 сут при 37° С. Из остальных клеток выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее с помощью рестриктазы *Bsp*I.

Авторы благодарны В. Г. Коробко (ИБХ АН СССР) за плазмиды pLZ3, pLZ4 и pLZ52, М. И. Ривкину за штамм *E. coli* CSH36, С. А. Чувшило, Ю. С. Нечасву за препараты ферментов, А. Н. Синякову за синтез олигонуклеотидов и Л. П. Тихомировой за штамм λ⁺.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jouse K. M., Grindley N. D. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 7, p. 1830-1834.
2. Leplatois P., Danchin A. Biochemie, 1983, v. 65, № 6, p. 317-324.
3. Boer H. A., Comstock L. J., Hui A., Wong E., Vasser M. In: Gene amplification and analysis/Eds Papas T. S., Rosenberg M., Chirikjian J. G. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1983, v. 3, p. 103-116.
4. Lantemberger J. A., Kan N. C., Court D., Pry T., Showalter S., Papas T. S. In: Gene amplification and analysis/Eds Papas T. S., Rosenberg M., Chirikjian J. G. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1983, v. 3, p. 147-174.
5. Stueber D., Bujard H. EMBO J., 1982, v. 1, № 11, p. 1399-1404.
6. Bujard H., Baldari C., Brunner M., Denschle U., Gentz R., Hughes J., Kammerer W., Stueber D. In: Gene amplification and analysis/Eds Papas T. S., Rosenberg M., Chirikjian J. G. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1983, v. 3, p. 65-88.
7. Soberon X., Covarrubias L. Gene, 1980, v. 9, № 3, p. 287-305.
8. Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L., Boyer H. W., Crossa J. H., Falkow S. Gene, 1977, v. 2, № 1, p. 95-113.

9. Brosius J., Cate R. L., Perlmutter A. P. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 15, p. 9205-9210.
10. Sutcliffe J. G. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1978, v. 43, p. 77-90.
11. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. И., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Оникиенко А. И., Плетнев А. Г., Мигина Ю. А. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 6, с. 840-847.
12. Li-He Guo, Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 6, p. 2065-2084.
13. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Petersen G. B. *J. Mol. Biol.*, 1982, v. 162, № 4, p. 729-773.
14. West R., Rodriguez R. L. *Gene*, 1982, v. 20, № 2, p. 291-304.
15. Коробко В. Г., Добрылин В. Н., Нгуен Куанг Винь, Подладчикова О. И., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чувпило С. А., Колосов М. Н. *Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 9, с. 1285-1289.
16. Miller J. H. In: *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1972.
17. Petrov N. A., Karginov V. A., Mikriukov N. N., Serpinski O. I., Kravchenko V. V. *FEBS Lett.*, 1981, v. 133, № 2, p. 316-320.
18. Birnboim H. C., Doly J. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 7, № 6, p. 1513-1523.
19. Кравченко В. В., Серпинский О. И., Силяков А. Н., Попов С. Г. *Биоорган. химия*, 1984, т. 10, № 2, с. 220-225.
20. Чувпило С. А., Кравченко В. В. *Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 12, с. 1634-1637.
21. Vogt V. M. *Eur. J. Biochem.*, 1973, v. 33, № 1, p. 192-196.
22. Ross G. W., O'Callaghan C. N. In: *Methods in enzymology*/Ed. Hash J. H. N. Y.: Acad. Press, 1975, v. 43, p. 69-85.

Поступила в редакцию
11.IX.1984

A PLASMID VECTOR FOR TEMPERATURE-CONTROLLED EXPRESSION

KRAVCHENKO V. V., YAMSHCHIKOV V. F.*, PLETNEV A. G.*

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

A 169 b.p. fragment including the *bla* gene promoter p_s has been removed from pBR327 plasmid, and the deleted plasmid used for cloning the *TaqI/BglII*-fragment of the λ c1857*ind*⁻ DNA containing promoter p_R and gene *cl* to obtain plasmid pCE119. Cells containing pCE119 produced a high level of β -lactamase at 42° C, the yield at 42° C being 100 times higher than at 32° C. For cloning and functional assays a pCEZ12 plasmid was constructed, in which promoter p_R and repressor *cl* of λ phage control the expression of the semi-synthetic β -galactosidase gene. Yield of β -galactosidase produced by pCEZ12 at 42° C was ca. 300 times higher than at 32° C.