



УДК 577(214.625+217.52) : 577.113.6

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА ЭКСПРЕССИОННОГО ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ РЕГУЛИРУЕМОГО ТЕМПЕРАТУРОЙ ПРОМОТОРА $P'_R$ ДНК БАКТЕРИОФАГА $\lambda$

*Петренко Л. А., Гилева И. П., Кравченко В. В.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт  
молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Описано получение плазмидного вектора рSEQ3 для регулируемой температурой экспрессии генов на основе регуляторных блоков  $cI$ - $P_R$  и  $Q$ - $P'_R$  ДНК фага  $\lambda$ . Транскрипция гена антитерминаторного белка  $Q$ , позитивно регулирующего промотор  $P'_R$ , находится в плазмиде рSEQ3 под прямым контролем промотора  $P_R$ , управляемого термочувствительным репрессором  $cI$ . Таким образом, транскрипция с промотора  $P'_R$  регулируется температурой.

Экспрессионные свойства полученного вектора исследованы на примере клонирования в плазмиде рSEQ3 полусинтетического гена  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* (*lacZ*) и искусственного гена лейкоцитарного интерферона человека (*ifn $\alpha$ 2*).

Исследованы три режима экспрессии: 30°С — «выключено», 37°С — «включено», 42°С — «включено». Показано, что при 30°С наблюдается синтез незначительного количества продуктов клонированных генов. В противоположность этому при 37 и 42°С происходит интенсивный синтез  $\beta$ -галактозидазы или интерферона  $\alpha$ 2, причем оптимальной является температура 37°С, при которой уровень экспрессии выше, чем при 42°С.

Высокий уровень экспрессии в клетках *E. coli* гена, встроенного в векторную молекулу ДНК плазмиды или бактериофага, определяется в первую очередь эффективностью транскрипции и трансляции этого гена. При этом полезным для векторной системы свойством является контроль транскрипционной активности, поскольку при конструктивном синтезе высокий уровень экспрессии даже нормального нетоксичного продукта может быть неблагоприятным для клетки и вести к понижению стабильности системы хозяин — вектор [1, 2].

В молекулярно-биологических исследованиях для синтеза чужеродных белков в бактериях *E. coli* применяется ряд плазмидных векторов, содержащих эффективные промоторы фага  $\lambda$   $P_R$  и  $P_L$ , регулируемые термочувствительным репрессором  $cIts$  857 [2–6]. Известно, что при 42°С происходит полная инактивация репрессора  $cIts$  и обеспечивается максимальный уровень транскрипции с этих промоторов. При 30°С репрессор  $cIts$  практически полностью блокирует транскрипцию с промоторов  $P_R$  и  $P_L$ . Это обстоятельство позволяет контролировать включение активности промотора и, таким образом, осуществлять индукцию синтеза специфического продукта в *E. coli* повышением температуры с 30 до 42°С [2–6]. Однако применение векторов с термочувствительным репрессором  $cI$  осложняется отрицательным влиянием системы теплового шока *E. coli* при 42°С на синтез белка (особенно термочувствительного) и устойчивость всей системы плазмиды — клетка [2, 7]. В связи с этим в последнее время предпринимаются попытки усовершенствования подобных векторов. В частности, разработана система с индуцируемой *in vivo* инверсией сильного промотора  $P_{lac}$ , в которой продолжительность теплового шока при индукции сведена к минимуму (10 мин, 42°С). Тем не менее в работе [8] отмечено, что при таких условиях наблюдается нестабильность плазмидосодержащих клеток и даже незначительный летальный эффект.

В настоящей работе мы попытались сконструировать экспрессионный плазмидный вектор, лишенный указанных недостатков. В качестве основ-

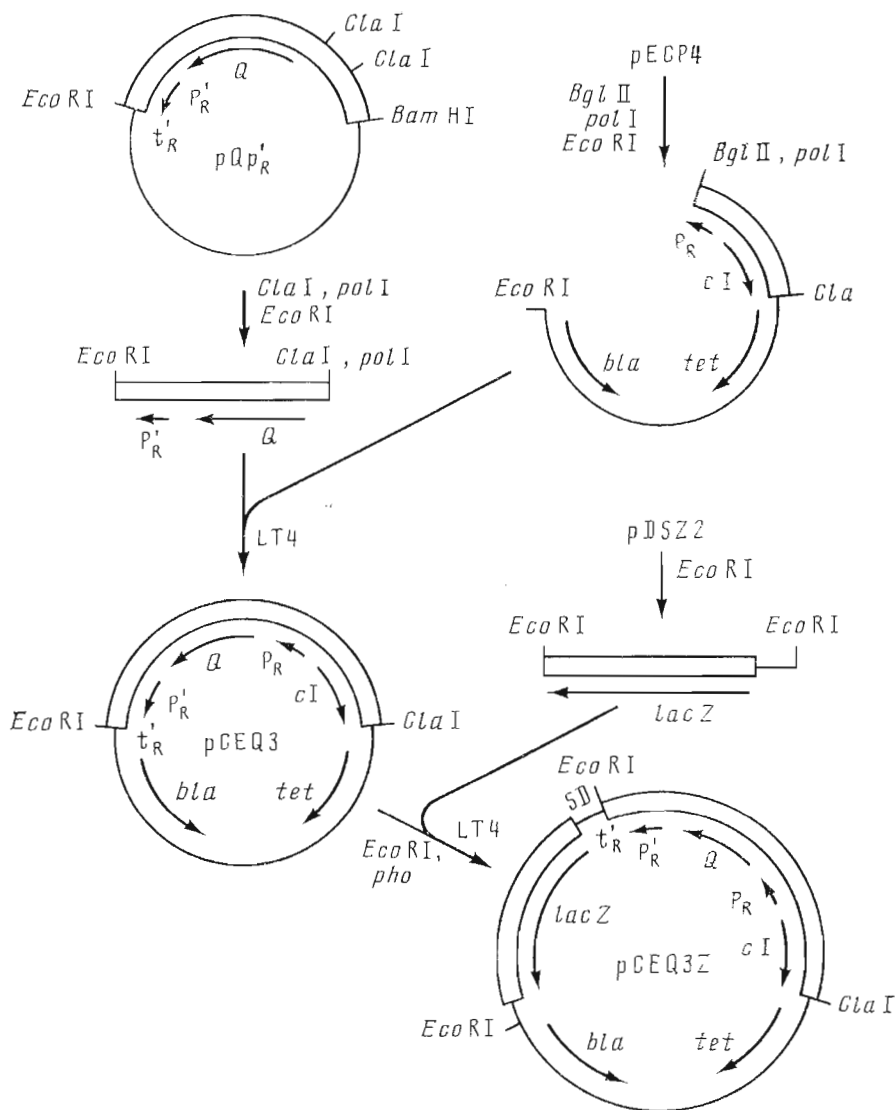


Рис. 1. Схема получения плазмид *pCEQ3* и *pCEQ3Z*. *pol I*, *pho* — ДНК-полимераза  $\lambda$  (фрагмент Клеюва) и щелочная фосфатаза соответственно; *LT4* — ДНК-лигаза фага T4; *SD* — сайт связывания рибосомы [17]. Рестрикционные карты плазмид *pDSZ2* и *pEQP4* описаны в работах [5, 6] соответственно. Указаны только те рестрикционные сайты, которые использовали при клонировании и анализе плазмид

ного элемента, регулирующего транскрипцию в таком векторе, использовали промотор  $P'_R$  ДНК бактериофага  $\lambda$  [9–14]. Известно, что промотор  $P'_R$  является самым мощным промотором фага  $\lambda$ , с которого при литическом развитии фага в присутствии белка *Q* продукта гена *Q* осуществляется синтез позднего транскрипта *R2*, содержащего цистроны для сборки фаговых частиц и лизиса клетки [15, 16]. За промотором  $P'_R$  в геноме фага следует мощный сигнал терминции  $t'_R$ , на котором в отсутствие белка *Q* транскрипция прерывается [10, 11, 15, 16]. При этом образуется короткий транскрипт длиной 198 нуклеотидных остатков (так называемая 6S РНК) [10, 11, 13]. Считается, что только в присутствии белка *Q* сигнал терминции преодолевается и транскрипция продолжается в область поздних генов [11, 13, 15]. Таким образом, активность транскрипции поздней области фага полностью определяется активностью белка *Q* и промотором  $P'_R$ .

Синтез белка *Q* в фаге находится под сложным регуляторным контролем [15]. Мы попытались упростить схему регуляции синтеза антитерми-

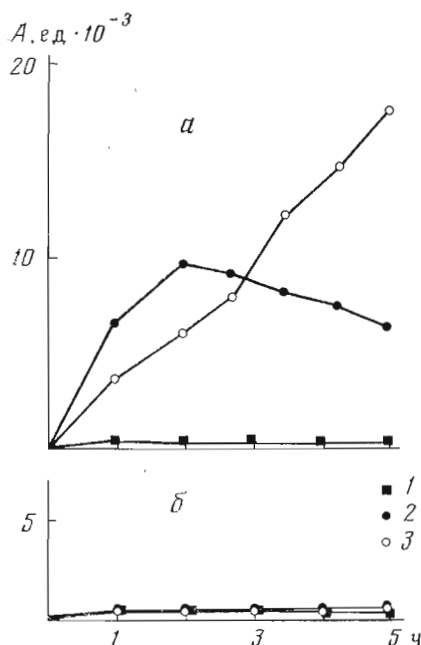


Рис. 2. Изменение активности  $\beta$ -галактозидазы в зависимости от времени роста плазмидосодержащих клеток *E. coli* CSH36: плазмиды pCEQ3Z (a) и pQNZ (б). А — активность фермента, рассчитанная по Миллеру [18]. 1–3 — активность плазмидосодержащих штаммов, растущих при 30, 42 и 37° С соответственно

натора Q, поместив его структурный ген под непосредственный контроль промотора  $P_R$ , управляемого термолabileм репрессором *cI*. Для этого фрагмент ДНК фага (44972–43824 — цифры обозначают координаты фрагмента в парах оснований по данным структуры ДНК, приведенным в работе [16]), фланкированный рестрикционными сайтами *ClaI* и *EcoRI*, был перенесен из плазмиды pQp<sub>R</sub> [14] в описанный ранее вектор pECP4 [6] по сайтам *BglIII* и *EcoRI* соответственно (рис. 1).

Можно видеть, что полученный вектор pCEQ3 состоит из двух регуляторных блоков: *cI-P<sub>R</sub>* и *Q-P'<sub>R</sub>*. Промотор  $P_R$  находится под контролем репрессора *cI* и ориентирован так, что транскрипция с него может обеспечивать синтез продукта гена Q, который в свою очередь должен обеспечивать эффективную транскрипцию с промотора  $P'_R$  в результате снятия терминации в районе терминатора  $t'_R$ . Известно, что при 30° С репрессор *cI* практически полностью блокирует активность промотора  $P_R$ , а при 42° С он инактивируется и  $P_R$  проявляет максимальную активность [2, 5], т. е. в плазмиде pCEQ3 (рис. 1) при 30° С оба регуляторных блока блокированы, а при 42° С должны иметь максимальную транскрипционную активность. Однако в созданном искусственном регуляторном блоке *cI-P<sub>R</sub>-Q-P'<sub>R</sub>* можно предполагать существование промежуточного состояния, которое может возникнуть при 37° С в результате частичной инактивации репрессора. В этом случае низкий уровень транскрипции с промотора  $P_R$  может оказаться достаточным для проявления максимальной активности промотора  $P'_R$  под действием небольших количеств антитерминатора.

Для проверки высказанных предположений в плазмиду pCEQ3 по сайту *EcoRI* встраивали *EcoRI*-фрагмент, выделенный из ДНК и содержащий ген *lacZ* плазмиды pCEZ12 [5]. На рис. 1 видно, что в плазмиде pCEQ3Z ген *lacZ* находится под контролем искусственного блока *cI-P<sub>R</sub>-Q-P'<sub>R</sub>*. Для анализа активности гена *lacZ* под контролем промотора  $P'_R$  плазмидой pCEQ3Z трансформировали клетки *E. coli* CSH36 и трансформанты использовали для анализа активности  $\beta$ -галактозидазы.

На рис. 2a приведены кинетические кривые синтеза  $\beta$ -галактозидазы в плазмидосодержащих клетках, выращенных при 30, 37 и 42° С в описанных ранее условиях [5]. Уровень синтеза фермента при выращивании при 30° С в течение 6 ч не изменяется и, по данным [5], соответствует фону. При 42° С происходит резкое увеличение активности  $\beta$ -галактозидазы

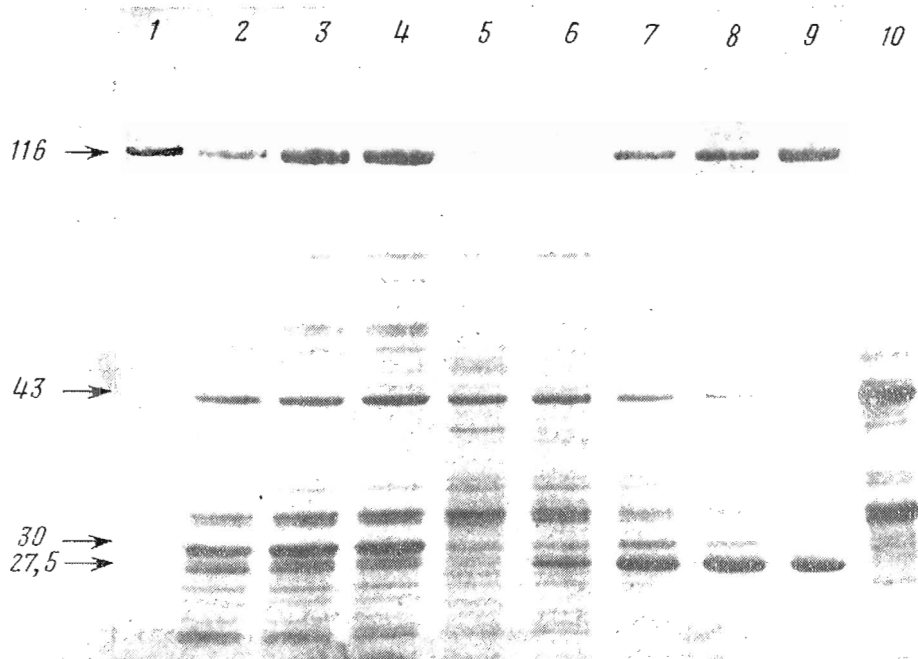


Рис. 3. Результаты гель-электрофореза в 8% ПААГ лизатов рСЕQ3Z-содержащих клеток *E. coli* CSH36, выращенных при различных температурах: 2–5 – 1,5; 3; 5 и 20 ч при 42° С; 6–9 – то же, что 2–5, но при 37° С; 10 – 20 ч при 30° С; 1 – очищенный препарат  $\beta$ -галактозидазы. Стрелками отмечено положение белков с молекулярной массой (приведена в килодальтонах)

в течение первых 2 ч после индукции, затем активность снижается. В противоположность этому при выращивании при 37° С происходит равномерное увеличение уровня синтеза фермента и к 4 ч роста клеток эта величина превышает максимальный уровень, наблюдаемый при 42° С (рис. 2а).

Параллельно с определением активности  $\beta$ -галактозидазы пробы анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле. В лизатах клеток, выращенных при 30° С, не наблюдали белка с молекулярной массой, соответствующей  $\beta$ -галактозидазе (рис. 3, дорожка 10). В лизатах клеток, выращенных при 37 и 42° С, галактозидаза однозначно идентифицируется на электрофореграмме (рис. 3). По данным электрофореза, количество  $\beta$ -галактозидазы в плазмидосодержащих клетках, выращенных при 37° С, в стационарной фазе роста клеток значительно превосходит количество фермента, синтезируемое при 42° С.

Интересно, что в плазмиде рСЕQ3Z ген  $\beta$ -лактамазы, имеющей свой промотор  $P_3$  [5, 19], попадает, кроме того, под контроль транскрипции с промотора  $P_R$  (рис. 1). Следовательно, можно ожидать возрастания концентрации этого белка параллельно с увеличением содержания  $\beta$ -галактозидазы. Действительно, вскоре после индукции наблюдается значительное увеличение скорости синтеза двух белков с молекулярной массой 27,5 и 30 кДа (по данным электрофореза, рис. 3). Размеры этих двух белков согласуются с ожидаемыми длинами молекул зрелой  $\beta$ -лактамазы и ее предшественника соответственно [20]. При этом большая часть  $\beta$ -лактамазы, синтезированной в клетках при 42° С, находится в форме предшественника (30 кДа), а при выращивании при 37° С преобладает зрелая форма – белок 27,5 кДа. Этот факт соответствует имеющимся литературным данным и объясняется влиянием теплового шока на механизм процессинга  $\beta$ -лактамазы в клетке [3].

Сравнение уровней синтеза  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -лактамазы в плазмиде рСЕQ3Z при 30, 37 и 42° С (рис. 2а и 3) позволяет однозначно заключить, что сконструированный экспрессионный вектор имеет три температурозависимых режима: 1) «выключено» – 30° С; 2) «включено» – 37° С; 3) «вклю-

чено» — 42° С. При этом оптимальным режимом для экспрессии генов является выращивание при 37° С.

Однако из представленных выше данных остается неясным, какой из элементов регуляторного блока  $cI-P_R-Q-P'_R$  в векторе рСЕQ3 играет решающую роль в индукции экспрессии клонированных в нем генов. Данные о регуляции экспрессии поздних генов ДНК фага  $\lambda$  [10, 11, 15] позволяют предположить, что основная роль в качестве регулятора принадлежит белку Q. При этом индукция промотора  $P'_R$  при 37° С может быть объяснена тем фактом, что, хотя промотор  $P_R$ , обеспечивающий транскрипцию гена Q, деблокирован лишь частично, количество синтезируемого при этом белка Q оказывается достаточным для полной анитерминации и обеспечения максимальной активности промотора  $P'_R$ . Для подтверждения решающей роли продукта гена Q в обеспечении индукции промотора  $P'_R$  и высокого уровня экспрессии клонированного гена нами был получен вариант плазмиды рСЕQ3Z с дефектным геном Q. С этой целью плазмиду рСЕQ3Z расщепляли рестриктазой *Nco* I по уникальному сайту, расположенному в структурной части гена Q [14, 16], дотраивали образовавшиеся липкие концы ДНК-полимеразой I и вновь сшивали лигированием. В полученном варианте (плазмида рQNZ) в отличие от исходной плазмиды рСЕQ3Z отсутствовал сайт *Nco* I, что свидетельствует о нарушении нативной структуры гена Q. Плазмидой рQNZ трансформировали клетки *E. coli* CSH36 и исследовали уровень экспрессии  $\beta$ -галактозидазы при 30, 37 и 42° С. Из рис. 2б видно, что возрастание  $\beta$ -галактозидазной активности при 37 и 42° С, характерное для исходной конструкции рСЕQ3Z (рис. 2а), содержащей интактный ген Q, отсутствует в случае клеток, содержащих плазмиду рQNZ. Полученные данные позволяют считать, что в плазмидной векторной системе рСЕQ3 продукт гена Q действительно выполняет функцию анитерминатора транскрипции и необходим для осуществления экспрессии клонированного гена с промотора  $P'_R$ .

Для демонстрации пригодности векторной плазмиды рСЕQ3 для эффективной экспрессии не только прокариотических, но и эукариотических генов в нее встраивали искусственный ген человеческого лейкоцитарного интерферона  $\alpha 2$  (*ifn*  $\alpha 2$ ). С этой целью плазмиду рСЕQ3 расщепляли рестриктазой *Eco*RI, обрабатывали щелочной фосфатазой и лигировали с *Eco*RI-фрагментом, выделенным из плазмиды рIF6/8 [21] и содержащим искусственный ген *ifn*  $\alpha 2$ . В результате получено два типа плазмид (рQL11 и рQL6), различающихся по ориентации фрагмента с геном *ifn*  $\alpha 2$  по отношению к регуляторному блоку (рис. 4). В плазмиде рQL11 ген интерферона находится под контролем регуляторного блока  $cI-P_R-Q-P'_R$ , а в плазмиде рQL6 встроен в противоположном направлении. Можно было ожидать, что клетки *E. coli* с плазмидой рQL11 будут синтезировать интерферон, а клетки с плазмидой рQL6 нет. Для проверки этого предположения сравнивали

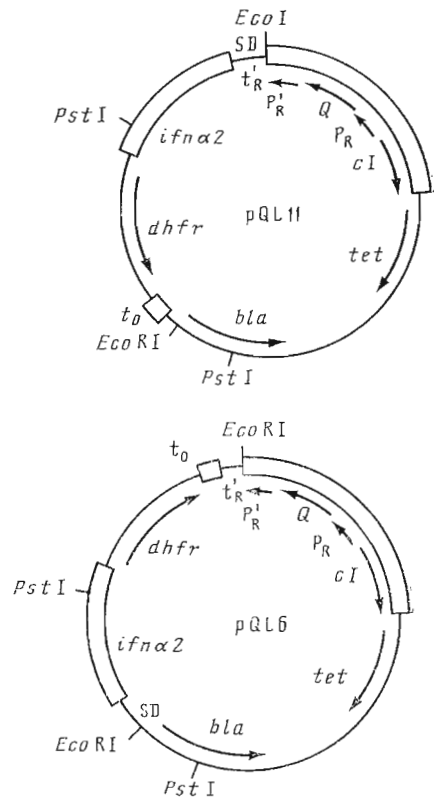


Рис. 4. Рестрикционные и генетические карты плазмид рQL11 и рQL6. *dhfr*, *ifn*  $\alpha 2$  — гены дигидрофолатредуктазы мыши и лейкоцитарного интерферона человека  $\alpha 2$ ;  $t_0$  — терминатор транскрипции ДНК фага  $\lambda$ ; SD — сайт связывания рибосом [21]

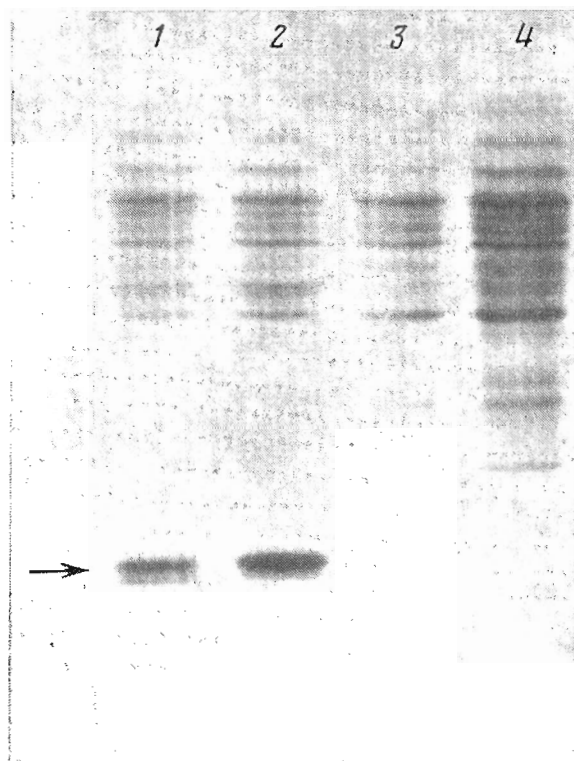


Рис. 5. Результаты гель-электрофореза в 12,5% ПААГ лизатов клеток *E. coli* CSH36, содержащих плазмиды rQL11 (дорожки 1, 2 и 4) и rQL6 (дорожка 3), 1, 2 — 2 и 5 ч при 37° С соответственно; 3 — 5 ч при 37° С; 4 — 5 ч при 30° С. Стрелкой отмечено положение интерферона, имеющего молекулярную массу около 18 кДа [21, 22]. Условия приготовления проб и проведения электрофореза описаны в «Экспер. части»

уровни синтеза интерферона в клетках *E. coli* с плазмидами rQL11 и rQL6, выращенных при 30 (режим «выключено») и 37° С (режим «включено»). На рис. 5 приведены результаты электрофоретического разделения суммарных лизатов плазмидосодержащих клеток, выращенных при 30 и 37° С. Видно, что в клетках с плазмидой rQL11 при индукции температурой 37° С синтезируется белок с молекулярной массой 18 кДа, идентичный по молекулярной массе лейкоцитарному интерферону  $\alpha 2$  [21, 22]. В тех же клетках, выращенных при 30° С, а также в клетках с плазмидой rQL6 такой продукт отсутствует.

Можно было предположить, что в клетках с плазмидой rQL11 происходит эффективный синтез интерферона. Действительно, лизат клеток, несущих плазмиду rQL11, проявлял биологическую активность лейкоцитарного интерферона с уровнем  $(3 \pm 0,5) \cdot 10^9$  МЕ/л. Лизаты этих же клеток без плазмиды и с плазмидой rQL6 не проявляли биологической активности интерферона. Результаты исследований позволяют заключить, что сконструированная плаزمида rQL11 при индукции в режиме 37° С обеспечивает в клетках *E. coli* эффективную экспрессию гена лейкоцитарного интерферона человека  $\alpha 2$ . Наблюдаемый уровень экспрессии интерферона значительно превосходит таковой для векторов, использующих индукцию при 42° С [23, 24].

Таким образом, промотор  $P'_R$  фага  $\lambda$  впервые использован для регулируемой температурой экспрессии клонированных генов в плазмидном векторе. Включение экспрессии в векторе с промотора  $P'_R$  осуществляется температурной индукцией (37° С), что дает возможность значительно снизить неблагоприятное воздействие на синтезируемый продукт теплового шока, наблюдаемое при 42° С и выражающееся в денатурации, деградации и/или нарушении механизмов процессинга и секреции синтезируемых в

клетках *E. coli* белков ([7, 21], см. также рис. 2 и 3). Кроме того, в отличие от других векторных систем плазмид рСЕQ3 в качестве основного регулятора содержит продукт гена *Q* бактериофага  $\lambda$ , который является антитерминатором транскрипции [15, 25, 26], что гарантирует непрерывную транскрипцию клонируемой в таком векторе последовательности гена даже при наличии в ее составе транскрипционных терминаторов.

### Экспериментальная часть

В работе использованы штамм *E. coli* CSH36 (F $\Delta$ (*lac, pro*)*supE, thi*) и плазмиды pQR $\lambda$ ' [14], pECP4 [6], pDSZ2 и pCEZ12 [5], pIF6/8 [22].

Выращивание клеток *E. coli* производили на среде LB [18], содержащей в случае плазмидных штаммов антибиотика ампициллина (50 мкг/мл) или тетрациклина (10 мкг/мл) в зависимости от типа плазмиды. Селекцию клонов *E. coli* проводили на чашках с LB-агаром, содержащим антибиотик (те же концентрации), а в случае клонов, содержащих ген *lacZ*, — и с добавлением 5-бром-4-хлор- $\beta$ -D-индолилгалактозида (40 мкг/мл; Sigma, США).

Рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* — производства НИКТИ БЛВ (г. Бердск). Рестриктазы *BglII*, *ClaI*, *NcoI* и ДНК-лигаза фага T4 любезно предоставлены С. Х. Дегтяревым (ВНИИ МБ, Кольцово), а ДНК-полимераза I из *E. coli* — Ю. С. Нечаевым (ВНИИ МБ, Кольцово).

Использованные в работе плазмиды были выделены щелочным методом с модификациями, описанными в работе [5].

Условия обработки ДНК различными ферментами, выделения фрагментов ДНК и трансформация клеток *E. coli* рекомбинантными плаزمидами описаны ранее в работе [5].

**Получение плазмиды рСЕQ3.** Плазмидную ДНК pQR $\lambda$  гидролизovali рестриктазой *ClaI*, в полученную реакционную смесь добавляли до 50 мМ dATP, dCTP, dGTP, TTP, ДНК-полимеразу I (фрагмент Кленова), инкубировали 30 мин при 10°С и после фенольной экстракции и переосаждения ДНК из 0,3 М ацетата натрия, pH 7,0, гидролизovali рестриктазой *EcoRI*. Полученные фрагменты ДНК разделяли в 3% ПААГ, векторную часть *EcoRI* — *BglII* выделяли из геля методом электрофокации и использовали для лигазной реакции.

3 мкг полученного вектора *EcoRI* — *BglII* лигировали с 1 мкг выделенного фрагмента *ClaI* — *EcoRI* из pQR $\lambda$  и полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* CSH36. Отбор трансформантов проводили на чашках с агаром, содержащим ампициллин. Структуру ДНК плазмиды рСЕQ3, выделенной из полученных клонов, подтверждали рестрикционным анализом.

**Получение плазмиды рСЕQ3Z.** ДНК плазмиды рСЕQ3 гидролизovali рестриктазой *EcoRI*, фермент инактивировали нагреванием до 70°С в течение 10 мин, затем обрабатывали ДНК щелочной фосфатазой *E. coli* и удаляли белок экстракцией смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24:1), ДНК осаждали спиртом и растворяли в буфере 10 мМ трис-HCl (pH 7,8), 0,5 мМ EDTA (ТЕХ1).

1 мкг приготовленного таким образом вектора лигировали с 1 мкг *EcoRI*-фрагмента, выделенного электрофорезом в 3% ПААГ из *EcoRI*-гидролизата плазмиды pDSZ2 и содержащего ген *lacZ* [5, 17].

Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* CSH36. Селекцию трансформантов проводили на чашках с LB-агаром, содержащим ампициллин и Xgal. Из окрашенных колоний выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному анализу. На основании данных рестрикционного анализа был отобран вариант, содержащий ген  $\beta$ -галактозидазы под непосредственным контролем промотора *P* (обозначен рСЕQ3Z).

**Получение плазмиды рQNZ.** ДНК рСЕQ3Z гидролизovali рестриктазой *NcoI*, фермент инактивировали нагреванием при 70°С в течение 10 мин, смесь осаждали и промывали ДНК спиртом, растворяли в буфере ТЕХ1 и обрабатывали ДНК плазмиды ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова) в присутствии 50 мМ dATP, dCTP, dGTP и TTP. Обработанную таким образом ДНК плазмиды лигировали и полученной смесью трансформировали клетки *E. coli*. Отсутствие сайта *NcoI* в полученных плаزمидах подтверждали рестрикционным анализом.

**Получение плазмид рQL6 и рQL11.** ДНК вектора рСЕQ3Z *EcoRI*, полученного так же, как для плазмиды рСЕQ3, лигировали с фрагментом, выделенным электрофорезом в 4% ПААГ из *EcoRI*-гидролизата плазмиды pIF6/8 и содержащим ген лейкоцитарного интерферона человека  $\alpha 2$ . Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* CSH36. Отбор клонов, содержащих ген интерферона  $\alpha 2$ , производили с помощью гибридизации, как описано ранее [27], используя  $^{32}$ P-меченый зонд из структурной части гена *ifn $\alpha$ 2*. У отобранных гибридизацией вариантов плазмид определяли ориентацию гена *ifn $\alpha$ 2* в векторе с помощью рестрикционного анализа.

**Анализ продуктов экспрессии клонированных генов. а. Условия выращивания плазмидосодержащих клеток *E. coli* CSH36.** В колбы, содержащие по 50 мл среды LB с ампициллином, засеивали (1:1000) свежую культуру клеток *E. coli* CSH36, содержащих плазмиды рСЕQ3Z, рQNZ, рQL6 или рQL11 (в каждом случае по три колбы)

и выращивали при 30°С на качалке при 100 об/мин (New Brunswick G-24, США) до плотности 0,3 ОЕ/мл (550 нм). Затем одну колбу переносили в качалку с температурой 42°С, вторую — в качалку с температурой 37°С, третью продолжали инкубировать при 30°С. Через каждый час отбирали аликвоты (1 мл) для измерения плотности культуры, анализа активности  $\beta$ -галактозидазы (или интерферона  $\alpha 2$ ) и пробу для электрофоретического анализа суммарного клеточного белка.

б) Активность  $\beta$ -галактозидазы определяли по скорости гидролиза *o*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактозида, как описано в работе [25].

в) Биологическую активность интерферона  $\alpha 2$  определяли как описано ранее в работе [27].

г) Электрофоретический анализ суммарного клеточного белка. Приготовление гелей и проб для электрофореза описано ранее [5]. Перед нанесением на гель пробы выдерживали 10 мин при 100°С и наносили на 8 или 12,5% ПААГ с додецилсульфатом натрия по 7 мкл образца.

Авторы благодарны М. И. Ривкину за штамм *E. coli* CSH36.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Joyce C. M., Grindley N. D. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 7. P. 1830–1834.
2. Leplatois P., Danchin A. // Biochimie. 1983. V. 65. № 6. P. 317–324.
3. Remaut E., Stanssens P., Fiers W. // Gene. 1981. V. 15. № 1. P. 81–93.
4. Shirakawa M., Tsurimoto T., Matsubara K. // Gene. 1984. V. 28. № 1. P. 127–132.
5. Кравченко В. В., Ямщиков В. Ф., Плетнев А. Г. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 523–533.
6. Кузнецов К. Д., Ривкин М. И., Кумарев В. П., Кравченко В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 286. № 4. С. 1012–1015.
7. Goff S. A., Casson L. P., Goldberg A. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 21. P. 6647–6651.
8. Podhajski A. J., Hasan N., Szybalski W. // Gene. 1985. V. 40. № 1. P. 163–168.
9. Herskowitz I., Singer E. R. // J. Mol. Biol. 1970. V. 47. № 3. P. 545–556.
10. Roberts J. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 9. P. 3300–3304.
11. Grayhack E. J., Yang X., Lau L. F., Roberts J. W. // Cell. 1985. V. 42. № 1. P. 259–269.
12. Szybalski W. // Regulatory Biology/Eds Copeland J. C., Marzluff G. A. Ohio State University Press, Columbus OH, 1977. P. 3–45.
13. Кравченко В. В., Василенко С. К., Гилева И. П., Зайцев Б. Н. // Биоорганическая химия. 1980. Т. 6. № 2. С. 217–222.
14. Petrov N. A., Karginov V. A., Mikriukov N. N., Serpinski O. I., Kravchenko V. V. // FEBS Lett. 1981. V. 133. № 2. P. 316–320.
15. Szybalski E. H., Szybalski W. // Gene. 1979. V. 7. № 3/4. P. 217–220.
16. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Petersen G. B. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. № 4. P. 729–773.
17. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Нгуен К. В., Подладчиков О. Н., Северцова И. В., Быстров П. С., Болдырева Е. Ф., Чувило С. А., Колосов М. Н. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1285–1289.
18. Миллер Дж. // Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. С. 324–327.
19. Brosius J., Cate R. L., Perlmutter A. P. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 15. P. 9205–9210.
20. Sutcliffe J. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 8. P. 3737–3741.
21. Гилева И. П., Мизенко Г. А., Серпинский О. И., Аммосов А. Д., Кравченко В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 4. С. 734–737.
22. Staehelin T., Hobbs D. S., Kung H., Pestka S. // Meth. Enzymol. 1981. V. 78. Part II. P. 505–512.
23. Remaut E., Stanssens Y., Fiers W. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 14. P. 4677–4688.
24. Lorenzetti R., Dani M., Lappi D. A., Martinean D., Casati M., Monaco I., Shatzman A., Rosenberg M., Soria M. // Gene. 1985. V. 39. № 1. P. 85–87.
25. Somasekhar G., Szybalski W. // Gene. 1983. V. 26. № 2/3. P. 291–294.
26. Grayhack E. J., Roberts J. W. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 15. P. 9192–9196.
27. Колосов М. Н., Коробко В. Г., Добрынин В. Н. и др. Способ получения искусственного гена интерферона  $\alpha 2$  человека и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим синтезом. А. с. 1092176 СССР // Б. И. 1984. № 18.

Поступила в редакцию  
4.II.1987



A PLASMID VECTOR FOR GENE EXPRESSION UNDER THE CONTROL  
OF TEMPERATURE-REGULATED BACTERIOPHAGE  $\lambda$   
LATE PROMOTER  $P'_R$

PETRENKO L. A., GILEVA I. P., KRAVCHENKO V. V.

*All-Union Molecular Biology Research Institute,  
Koltsovo, Novosibirsk Region*

Plasmid expression vector using the temperature-regulated promoter  $P'_R$  of bacteriophage  $\lambda$  is described. The vector carries a combination of two regions of  $\lambda$ cI857ind<sup>-</sup> genome, that contain: 1) gene *cI* and promoter  $P_R$ , and 2) gene *Q* and promoter  $P'_R$ . Transcription of gene *Q* is initiated at promoter  $P_R$ , which is controlled by cI857 repressor. The *Q* gene product acts as a positive regulator of RNA synthesis from  $P'_R$ . At 37° C, sufficient amounts of protein *Q* are synthesised to initiate the expression of the cloned gene from  $P'_R$ . Inactivation of *Q* gene (by elimination of a single *NcoI* site) results in the loss of  $P'_R$  expression activity in the vector. *E. coli*  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ*) and human leukocyte interferon  $\alpha 2$  gene (*ifn $\alpha$ 2*) were cloned into a single *EcoRI* cleavage site under the control of  $P'_R$ . These constructs express high levels of  $\beta$ -galactosidase and interferon  $\alpha 2$  in *E. coli* at 37° C.