



УДК 577(214.625+217.52):577.113.6

КОНСТРУИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА ИСКУССТВЕННЫХ
ПОЛИЦИСТРОНОВ НА ОСНОВЕ УКОРГЧЕННЫХ ГЕНОВ
ТРИПТОФАНОВОГО ОПЕРОНА *E. COLI* И БЕЛКА
ОБОЛОЧКИ ФАГА M13

Кравченко В. В., Гилева И. П., Шагин В. В.,
Куличков В. А., Добрынин В. Н.*, Филиппов С. А.*,
Чувило С. А.*, Коробко В. Г.*

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

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина Академии наук СССР,
Москва

На основе плазмид серии pDS1 с использованием фрагментов гена лидерного пептида триптофанового оперона *E. coli* (тандем фрагмента *HhaI*-140) и гена белка оболочки фага M13 (фрагменты *TagI*-381 и *HaeIII*-1623) сконструированы векторы для экспрессии (pDS280, pDS381, pDS1623), содержащие промоторы P_{trp}, P_{PHI} и P_ψ+P_{PHI} соответственно. В полученных плазмидах клонировали искусственный ген лейкоцитарного интерферона α2 человека (*ifn-α2*) таким образом, чтобы он транскрибировался в составе соответствующей полицистронной мРНК. При этом терминация биосинтеза белка, предшествующего IFN-α2, происходила перед участком связывания рибосомы и сайтом инициации трансляции искусственного гена. Клетки *E. coli*, несущие рекомбинантные плазмиды с геном *ifn-α2*, обеспечивали высокий уровень синтеза интерферона. При сравнении количества интерферона α2, синтезируемого в клетках *E. coli* под контролем сигналов транскрипции и трансляции гена белка оболочки фага M13, обнаружено влияние длины полицистронной мРНК на уровень экспрессии искусственного гена *ifn-α2*.

Создание векторных систем, обеспечивающих высокий уровень экспрессии природных и искусственных генов в клетках бактерий, представляет значительный интерес. В последнее время для этой цели используют клонирование сильных промоторов в плазмидах серии pBR322 [1-3]. В результате встройки в такие плазмиды копии гена вместе с участками, обеспечивающими трансляцию (сайт SD и иницирующий кодон), удается получить хорошие выходы продукта клонированного гена [1-5]. Этот тип векторных систем соответствует природному моноцистронному оперону. В ряде случаев уровень экспрессии в векторах моноцистронного типа оказывается низким, что связано с возникновением вторичных структур в области мРНК, расположенной в окрестности сайта SD и иницирующего кодона [5-7].

Исследования механизмов регуляции трансляции природных полицистронных оперонов [8-12], а также эффектов реинициации трансляции в генах rIB фага T4 [13] и репрессора лактозного оперона *E. coli* [7, 14] указывают на то, что роль вторичных структур вблизи участка инициации трансляции, по-видимому, не является определяющей для экспрессии гена (или его части) в тех случаях, когда терминатор предшествующей трансляции и точка инициации полицистронного гена (или рестарт) находятся в пространстве, доступном для одновременного контакта с рибосомой. В пользу этого свидетельствуют также данные по экспрессии гена лейкоцитарного интерферона F в составе «гибридного оперона» [15] и гена β-галактозидазы в составе искусственного бицистрона [16]. Путем конструирования искусственных бицистронных оперонов

Сокращения: SD — участок связывания рибосомы, п.о.— пара оснований, LT4 — ДНК-лигаза фага T4, ДНК-полимераза A — фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli*, IFN — интерферон, *ifn* — ген интерферона, L — лидерный пептид триптофанового оперона *E. coli*.

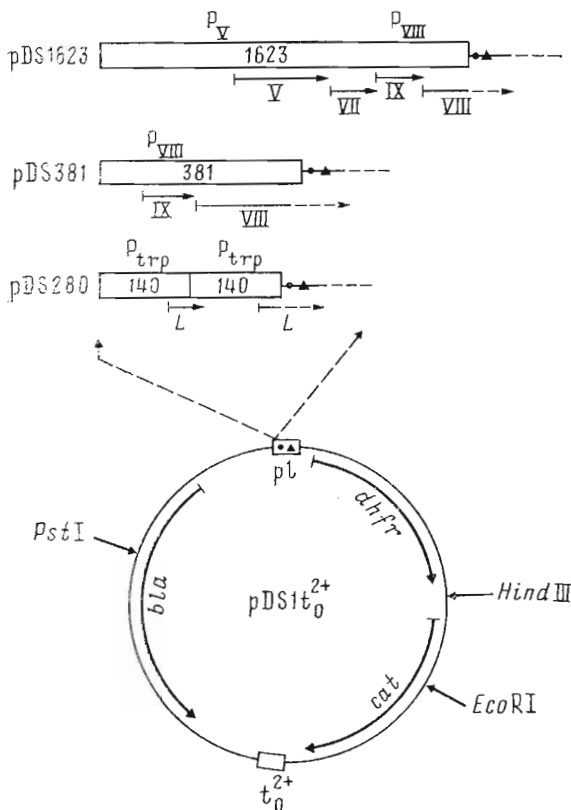
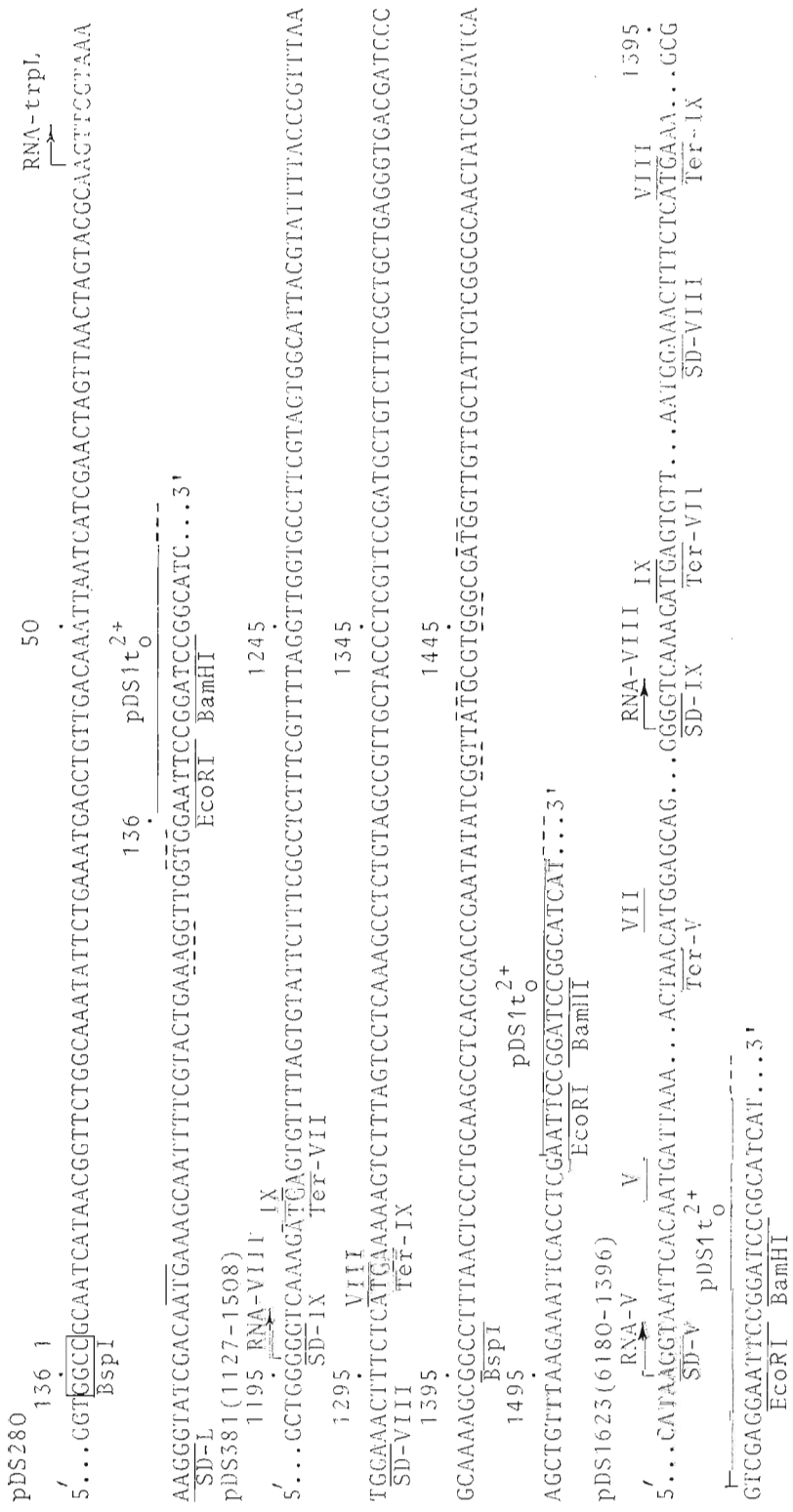


Рис. 1. Схемы плазмид $pDS1t_0^{2+}$, $pDS280$, $pDS381$ и $pDS1623$. Положения генов *bla*, *cat* и *dhfr*, рестрикционных сайтов *EcoRI*, *HindIII* и *PstI*, терминатора транскрипции (t_0^{2+}) и полилинкера (pl) на карте плазмиды $pDS1t_0^{2+}$ указаны по [18]. Сайты *EcoRI* и *BamHI* в составе полилинкера и вблизи места встройки фрагментов условно отмечены точкой и треугольником соответственно. Цифрами обозначены длины фрагментов в п.о. Положение промоторов (P_V , P_{VIII} , P_{trp}) и генов (гены V–IX фага M13 и *L* – часть гена лидерного пептида триптофанового оперона) в пределах клонированных фрагментов дано в соответствии с работами [19, 20]. Указаны только те рестриктные сайты, которые использовались при клонировании

показано, что уровень экспрессии второго гена значительно превышает уровень синтеза продукта первого гена [17]. В связи с этим значительный интерес представляет конструирование искусственных полицистронов и изучение экспрессии их генов с целью использования принципов регуляции трансляции полицистронов для создания эффективных экспрессионных систем.

В настоящей работе мы сконструировали серию плазмидных векторов, пригодных для получения искусственных полицистронов. С этой целью в плазмиде $pDS1t_0^{2+}$ [18] (рис. 1) клонировали фрагменты ДНК *E. coli* и бактериофага M13, выбранные таким образом, чтобы их можно было использовать в качестве первого гена в полицистроне. Для этого фрагмент должен содержать промотор, сигналы инициации трансляции (сайт SD и иницирующий кодон) и неполную часть гена с открытой рамкой трансляции. В соответствии с такими требованиями использовали фрагмент *HhaI*-140 (здесь и далее цифра обозначает длину фрагмента в п.о.) ДНК *E. coli* и фрагменты *TaqI*-381 и *BspI*-1623 ДНК бактериофага M13. Фрагмент *HhaI*-140 содержит промотор P_{trp} и часть гена лидерного пептида *L* триптофанового оперона [19]. В состав фрагментов *TaqI*-381 и *BspI*-1623 входили промоторы P_{VIII} и $P_V + P_{VIII}$ соответственно, а на конце оба фрагмента содержали укороченные части гена VIII (ген основного белка оболочки) бактериофага M13mp7 [20].



ний кодон гена лидерного пептида *L* указаны в соответствии с работой [19]. pDS381 и pDS1623: координаты фрагментов 381 и 1623 (цифры в скобках и наверху); сайты SD, терминирующие и инициирующие кодоны генов V, VII, IX и VIII указаны в соответствии с работой [20]. Участки SD и сайты трансляции основных генов подчеркнуты сплошной линией снизу и сверху соответственно. SD и стартовые сигналы дополнительных генетических тран-слайний помечены арабскими цифрами, но преобладающей линией

Рис. 2. Частичные нуклеотидные последовательности ДНК плазмид pDS280, pDS381 и pDS1623 в районе слипания кодирующих частей фрагментов 280, 381 и 1623 с векторной частью ДНК плазмиды pDS1t²⁺ (приведены структуры цепей, соответствующих мРНК). pDS280: цифрами помечены координаты фрагментов *Hha*I-140 с удаленными 3'-выступающими концами, а сайт BspI образован при мигровании в месте стыка 5'- и 3'-концевых частей двух таких фрагментов; сайт РНК с промотора Р_{trp}, сайт SD и инициирую-

В результате клонирования указанных выше фрагментов в плазмиде рDS1t₀²⁺ были получены рекомбинантные ДНК рDS280, рDS381 и рDS1623 (рис. 1). При конструировании плазмиды рDS280 (см. рис. 1 и «Экспериментальную часть») в качестве источника фрагмента *HhaI*-140 использовали ДНК рSK280.1 [21], несущую димер этого фрагмента. Структуры ДНК рDS280, рDS381 и рDS1623 были подтверждены с помощью рестриктоного анализа (использовали расщепление этих ДНК рестриктазами *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *HindIII*, *BspI* и *MspI* по отдельности и в комбинации), а также прямым секвенированием в районе встройки соответствующего фрагмента. Из частичных нуклеотидных последовательностей этих ДНК (рис. 2) можно видеть, что все три векторные плазмиды содержат промотор (или группу промоторов в случае рDS280 и рDS1623), сигналы инициации трансляции и неполную часть гена с открытой рамкой трансляции (см. рис. 1 и 2). Таким образом, плазмиды рDS280, рDS381 и рDS1623 представляют собой экспрессионные векторы полицистронного типа, в которых клонированный фрагмент содержит транскрипционный сигнал (промотор) и первый ген с открытой рамкой трансляции. По сайтам *EcoRI* или *BamHI* (см. рис. 1 и 2) в эти векторы может быть встроена второй ген с образованием искусственного бицистронного оперона любого типа.

Мы проверили применимость векторов рDS280, рDS381 и рDS1623 для экспрессии генов в составе искусственных полицистронов на примере синтетического гена лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$ человека (ген *ifn*). В качестве источника гена *ifn* использовали плазмиду рIF6/8, в которой этот ген экспрессируется в составе бицистронного оперона под контролем транскрипционных и трансляционных сигналов, входящих в состав фрагмента *TagI*-381 бактериофага M13 [17]. С целью получения гена *ifn*, удобного для клонирования в векторах типа рDS280, из ДНК рIF6/8 был выделен *PstI*-фрагмент, содержащий большую часть этого гена (без семи С-концевых кодонов) в составе бицистрона [17], и перенесен в *PstI/EcoRI*-векторную часть плазмиды рDS1t₀²⁺ в присутствии синтетических олигонуклеотидов, обеспечивающих восстановление С-концевой части гена *ifn* и одновременно выполняющих роль *PstI/EcoRI*-адаптера (рис. 3).

Полученная в результате плаزمида р381IFN по своей структуре фактически является производной рDS381, в которую по сайту *EcoRI* встроена искусственный ген *ifn* (см. рис. 3). Эта плазмида была охарактеризована рестриктоным анализом с помощью эндонуклеаз *BspI*, *XhoI*, *PstI* и *EcoRI*, а также прямым секвенированием участка ДНК, расположенного по обе стороны от сайта *XhoI* (см. рис. 3б). Было найдено, что первичная структура ДНК р381IFN слева от сайта *XhoI* до сайта *EcoRI* полностью идентична структуре соответствующего района ДНК рIF6/8 [17], а далее совпадает с нуклеотидной последовательностью ДНК рDS381 (см. рис. 2). Нуклеотидная последовательность ДНК р381IFN справа от сайта *XhoI* соответствовала ожидаемой и имела три отличия от структуры соответствующего участка гена *ifn* в ДНК рIF6/8. Эти отличия были заложены в структуре синтетического адаптера и не изменяли аминокислотной последовательности, кодируемой геном *ifn* (см. рис. 3б). Одна из замен С на А приводила к утрате сайта *PstI*, а другая изменяла терминатор трансляции TAG, присутствующий в гене *ifn* у родительской плазмиды рIF6/8 [17], на TAA. Замена терминатора TAG на TAA была обусловлена тем, что большинство супрессорных мутаций в лабораторных штаммах *E. coli* супрессируют именно кодон TAG, но не TAA [22].

Плазмиды р280IFN и р1623IFN были получены в результате замены *EcoRI/PstI*-фрагмента в плазмиде р381IFN на соответствующие фрагменты, выделенные из ДНК рDS280 и рDS1623 (рис. 4). Структура рекомбинантных плазмид р280IFN и р1623IFN была подтверждена рестриктоным анализом с помощью эндонуклеаз *BspI*, *XhoI* и *EcoRI*.

Для проверки уровня синтеза интерферона, обусловленного плазмидами р381IFN, р280IFN и р1623IFN, этими ДНК трансформировали клетки

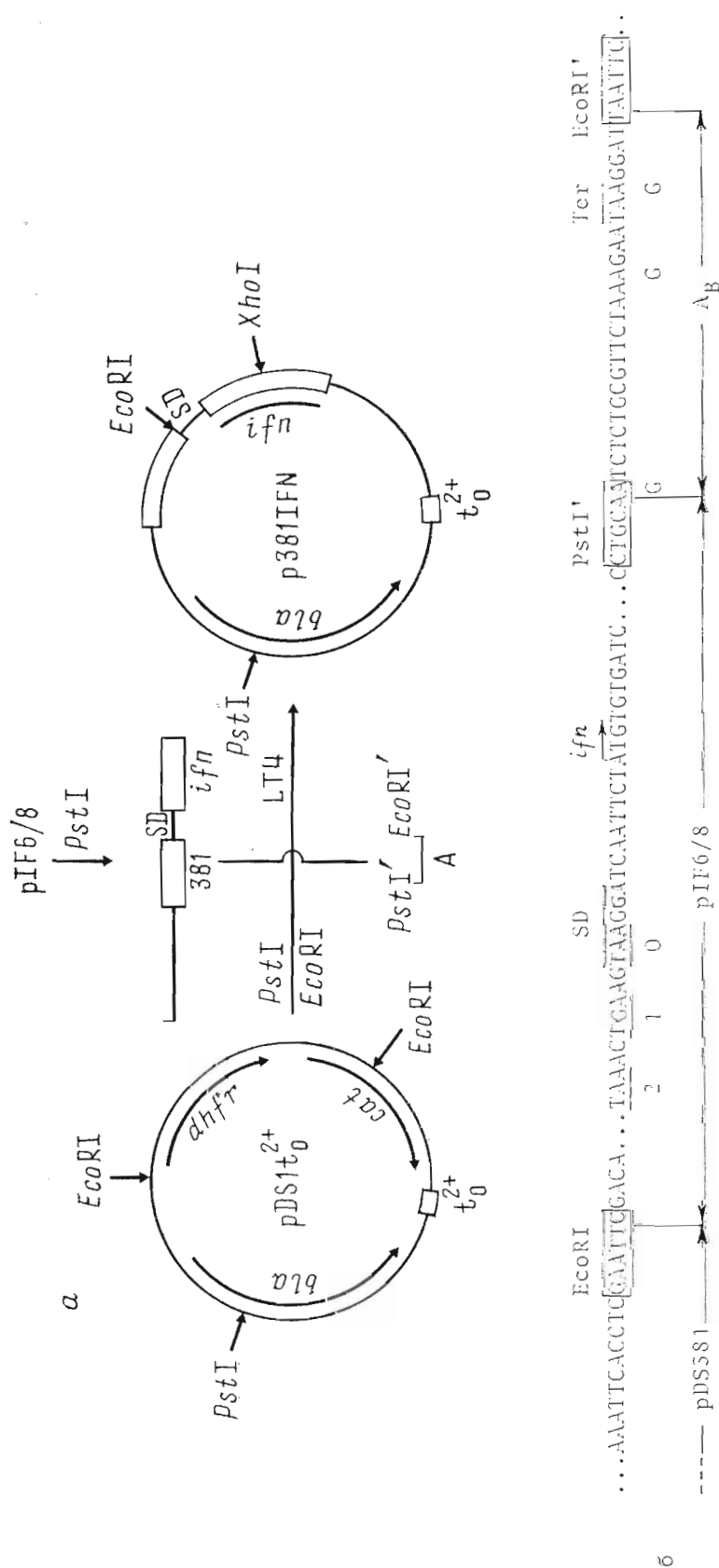


Рис. 3. Плазмида p381IFN. *a* — схема получения плазмиды p381IFN. PstI, EcoRI, XhoI — расщепление соответствующей рестриктазой; LT4 — слишка ДНК-лигазой фага T4 и трансформация клеток *E. coli*. Физическая карта плазмиды pIF6/8 описана в работе [17]. A — химически синтезированный адаптер, состоящий из двух комплементарных олигонуклеотидов (структура одного из них, верхней цепи Av, приведена на рис. 3б) с выступающими концами для клонирования по сайтам PstI и EcoRI (при этом сайты PstI и EcoRI не восстанавливаются; модифицируемые сайты обозначены PstI' и EcoRI'). б — частичная нуклеотидная последовательность ДНК p381IFN в окрестности вставки искусственного гена интерферона. В рамках помещены сайт EcoRI и модифицируемые сайты PstI' и EcoRI'. Отличия структуры гена *ifn* в плазмиде p381IFN от структуры в плазмиде pIF6/8 указаны (нуклеотиды G снизу), Av — нуклеотидная последовательность, соответствующая верхней цепи синтетического адаптера A (см. рис. 3а). Участок связывания Трансляция, инициирующая с основного старта гена VIII (см. рис. 2), терминируется понсенс-кодоном TAA (б), терминирующие кодоны 1 и 2 расположены в других рамках считывания.

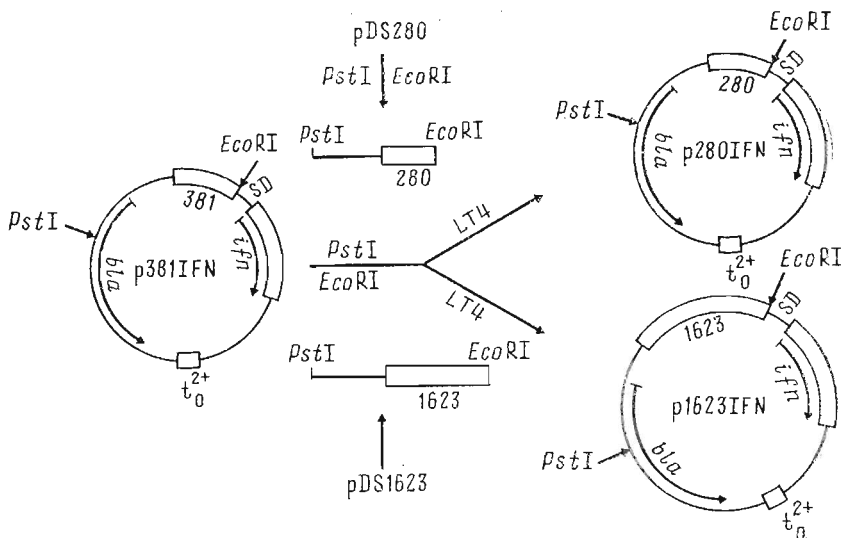


Рис. 4. Схема получения плазмид p280IFN и p1623IFN. Физические карты плазмид pDS280 и pDS1623 приведены на рис. 1. Другие обозначения такие же, как в подписи к рис. 3

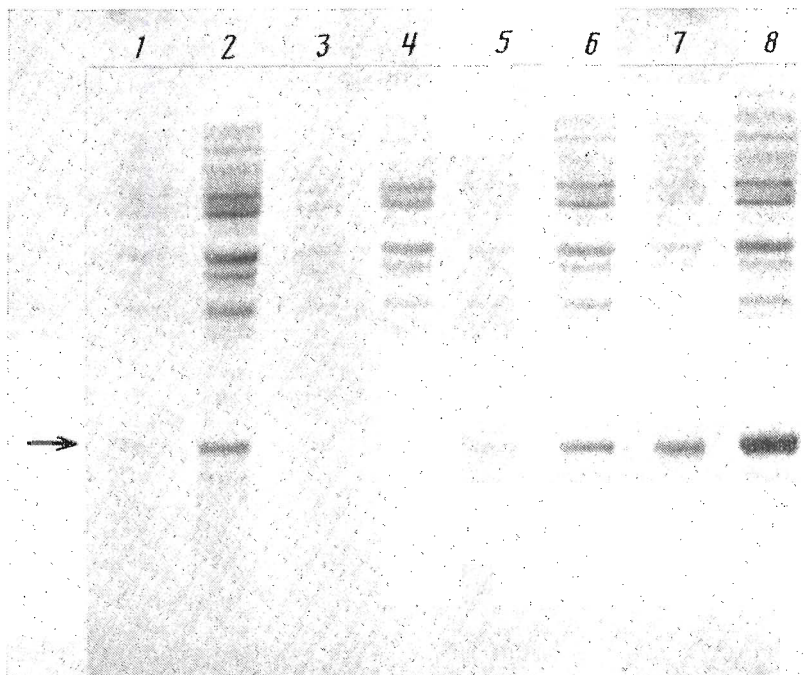


Рис. 5. Результаты электрофоретического разделения плазмидосодержащих клеточных лизатов в 12,5% ПААГ. Приготовление материала для анализа и условия электрофореза см. в «Экспер. части»; наносили на гель по 2 мкл (нечетные дорожки) и 5 мкл (четные дорожки) клеточного лизата. 1, 2 – pIF6/8; 3, 4 – p1623IFN; 5, 6 – p381IFN; 7, 8 – p280IFN. Положение интерферона указано стрелкой

E. coli SG20050, отдельные колонии выращивали в среде LB до плотности $\sim 10^9$ клеток/мл и суммарные клеточные лизаты анализировали с помощью электрофореза в 12,5% ПААГ (рис. 5). Процентное содержание интерферона в клеточных лизатах определяли денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Ultroscaп XL (LKB, Швеция). Параллельно эти же пробы анализировали радиоиммунологическим методом на присутствие лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$, как описано в работе [17]. В качестве контролей в этих экспериментах ис-

Экспрессионные свойства рекомбинантных плазмид

Плазмида	Промотор	Содержание интерферона в лизате клеток (в % к суммарному белку) *	Количество интерферона в мкг/мл культуры при 10 ⁸ кл./мл по данным РИА	Относительная «сила» промотора **
pDS280	P _{trp}	<0,1	0	210
pDS1623	P _V +P _{VIII}	<0,1	0	180
pDS381	P _{VIII}	<0,1	0	165
pIF6/8	P _{VIII}	11,2	24	10 ***
p381IFN	P _{VIII}	9,4	20	—
p1623IFN	P _V +P _{VIII}	0,6–0,9	1,7	—
p280IFN	P _{trp}	31	67	—

* Данные денситометрирования геля.

** Относительная сила промоторов выражена в концентрациях хлорамфеникола (мкг/мл), при которых скорость роста плазмидосодержащих клеток уменьшается в 2 раза по сравнению со скоростью роста в отсутствие этого антибиотика (см. «Экспериментальную часть»).

*** В плазмиде pIF6/8 перед геном *cat* расположен терминатор транскрипции [17], что приводит к снижению устойчивости к хлорамфениколу.

пользовали клетки *E. coli*, содержащие плазмиды pIF6/8 (положительный контроль), pDS280, pDS1623 и pDS381 (отрицательные контроли). Результаты проведенных анализов представлены в таблице.

Оценку «силы» промоторов, находящихся в составе фрагментов 280, 381 и 1623, проводили путем определения устойчивости к хлорамфениколу у штаммов *E. coli*, несущих плазмиды pDS280, pDS381 и pDS1623. Известно [18, 23], что при клонировании промоторов в плазмиде pDS1t²⁺ их относительная эффективность пропорциональна устойчивости к хлорамфениколу. Поэтому в качестве параметра характеризующего относительную транскрипционную активность промоторных фрагментов 280, 381 и 1623, использовали концентрацию хлорамфеникола, при которой скорость роста плазмидосодержащего штамма уменьшается в 2 раза по сравнению со скоростью роста этого же штамма в отсутствие антибиотика. Результаты этих экспериментов приведены в таблице.

Из сравнения уровней экспрессии гена *ifn* в штаммах с плазмидами p280IFN, p381IFN и p1623IFN и относительной транскрипционной активности промоторных фрагментов 280, 381 и 1623 (см. таблицу) следует, что в случае фрагментов 381 и 1623 между этими двумя характеристиками нет прямой корреляции. Действительно, принимая во внимание данные по уровням синтеза интерферона и относительной «силы» промоторов для случая фрагментов 280 и 381 (см. таблицу, плазмиды pDS280 и pDS381, p280IFN и p381IFN), можно было ожидать, что штамм с плазмидой p1623IFN будет синтезировать по крайней мере не меньшее количество интерферона, чем штамм с p381IFN. Однако обнаружено, что плазмида p1623IFN определяет уровень синтеза интерферона практически на порядок меньше, чем p381IFN (см. таблицу). Это не было связано с различиями в копиях плазмид, так как было показано, что плазмиды p280IFN, p381IFN и p1623IFN имеют практически одинаковую копияность (оценка сделана по результатам определения соотношения хромосомной и плазмидной ДНК). Делеция во фрагменте 1623 (см. рис. 2) не затрагивает 5'-концевой области мРНК, инициируемой с промотора P_{VIII}, поэтому кажется маловероятным, что стабильность 5'-концов P_{VIII}-мРНК в случае фрагментов 381 и 1623 сильно различаются.

Для полицистронных оперонов известно явление взаимосвязанной трансляции (coupling translation), отражающее влияние эффективности трансляции одного гена на трансляционную активность следующего за ним цистрона или группы цистронов [9–12]. Рассмотрим в рамках механизма взаимосвязанной трансляции [12] кодирующие IFN полицистронные мРНК, образующиеся в плазмидах p1623IFN и p381IFN. На 5'-конце мРНК с промотора P_{VIII} в плазмиде p381IFN (см. рис. 2 и 3) расположена последовательность SD и инициирующий кодон гена IX, а терминатор трансляции этого гена сцеплен с инициирующим кодоном гена VIII

(AUGA, [20] и рис. 2). Кроме того, в пределах кодирующей части гена VIII имеются три дополнительных гипотетических старта инициации трансляции, дающих открытые рамки считывания (см. рис. 2). В случае плазмиды p1623IFN трансляция IFN может происходить с двух мРНК, соответствующих стартам транскрипции с промоторов P_V и P_{VIII} (см. рис. 2, 3 и [20]). По сравнению с плазмидой p381IFN в плазмиде p1623IFN в P_{VIII}-мРНК отсутствуют два дополнительных гипотетических старта трансляции (см. рис. 2). Следует также отметить, что в случае плазмиды p1623IFN, участок, кодирующий IFN, находится на конце полицистронный мРНК, образующейся на матрице с последовательно расположенными генами V—VII—IX—VIII фага M13 [20]. Таким образом, кодирующие IFN полицистронные мРНК, образующиеся в случае плазмид p1623IFN и p381IFN, различаются по функциональной организации. По-видимому, это и приводит к отрицательной (плазмида p1623IFN) или положительной (плазмида p381IFN) интерференции в синтезе IFN при трансляции. Из сравнения кодирующих IFN P_{VIII}-мРНК с плазмид p1623IFN и p381IFN (см. рис. 2) и данных по экспрессии гена *ifn* с этих матриц (см. таблицу) можно предполагать, что усиление трансляции IFN связано с интерферирующим действием трансляции, иницируемой на дополнительных стартах. По-видимому, положительная интерференция между основной и дополнительными трансляциями в IFN-мРНК, образующейся в плазмиде pIF6/8 с промотора P_{VIII}, приводит к значительному превышению уровня экспрессии гена *ifn* по отношению к основному продукту гена VIII — белку В [17].

Таким образом, на основе укороченных частей генов триптофанового оперона *E. coli* и белка оболочки фага M13 сконструированы экспрессионные векторные плазмиды полицистронного типа и продемонстрирована их эффективность на примере экспрессии синтетического гена лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$ человека в составе искусственного полицистрона. Обнаружено влияние функциональной организации полицистронной матрицы на уровень экспрессии клонированного гена, для объяснения которого дополнительно к механизму взаимосвязанной трансляции [12] высказано предположение о положительной интерференции между основной и дополнительной трансляцией, вызывающей усиление экспрессии дистального гена.

Экспериментальная часть

В работе использовали штаммы *E. coli* C600 (коллекция лаборатории) и *E. coli* SG 20050 (получен от Г. Бужара, ФРГ); бактериофаг M13mp7; плазмиды pIF6/8 [17], pDS1₆⁺ [18] и pSK280.1 [21]; рестриктазы (КФ 3.1.23. x) *EcoRI*, *BspI*, *PstI*; ДНК-лигаза фага T4 (КФ 6.5.1.1), дезоксирибонуклеозиды, ДНК-полимеразу А (КФ 2.7.7.7) (НИКТИ БАВ, Бердск); [α -³²P]dNTP (2000–3000 Кт/ммоль), рестриктазы *XhoI*, *BamHI*, *HindIII*, *MspI* (Amersham, Англия); dNTP, ATP, ампициллин и хлорамфеникол (Sigma, США).

Общие сведения об эксперименте (условия обработки ДНК различными ферментами при получении рекомбинантных плазмид *in vitro*, электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в ПААГ, выделение фрагментов из геля, трансформация клеток *E. coli*, выделение плазмидных ДНК, выращивание плазмидосодержащих клеток *E. coli* и анализ нуклеотидной последовательности ДНК) см. в работах [16, 24].

Олигонуклеотидный синтез выполняли в масштабе 0,6–1 мкмоль на пористых стеклах CPC-10 (500 Å) фосфитным методом с использованием автоматического синтезатора ДНК System 1 (Beckman, США). Нарядивание олигонуклеотидных цепей осуществляли с помощью 5'-диметокситригил-N'-ацил-2'-дезоксинуклеозид-3'-(N,N-диизопропиламино)- β -цианэтилфосфитов, активированных тетразолом. Для каждой межнуклеотидной конденсации использовали 10–12 мкмоль фосфорамидита и 50 мкмоль дважды сублимированного тетразола. Непрореагировавшие 5'-гидроксильные группы кэпировали действием уксусного ангидрида в ацетонитриле в присутствии 4-диметиламинопиридина. Окисление межнуклеотидных фосфитов в фосфаты проводили действием 0,1 н. раствора йода в водном тетрагидрофуране в присутствии 3,6-лутидина. 5'-Диметокситригильные группы удаляли с помощью трихлоруксусной кислоты в нитрометане, содержащем метанол.

Выделение олигонуклеотидов осуществляли после удаления P- и N-защитных групп и снятия олигонуклеотида с носителя в виде 5'-диметокситригильных производных с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонках Zorbax C-8 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате триэтиламония. Окончательную очистку олигонуклеотидов проводили после удаления

5'-диметокситрипильной группы с помощью ВЭЖХ на тех же колонках или электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле.

Рекомбинантные ДНК конструировали в стандартных условиях [16]. Лигазная смесь (конечный объем 30 мкл) содержала по 0,2–0,3 мкг сшиваемых фрагментов (синтетические олигонуклеотиды, по 100 пкмоль каждого, негосбозовали нефосфорилированными), 0,3 мкг векторной части и 1–2 эк. акт. ДНК-гилазы фага T4 в буфере состава: 20 мМ трис-HCl (рН 7,8), 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ Na₂-EDTA, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и 0,5 мМ АТФ. Лигирование осуществляли 10–14 ч при 12° С. Реакцию останавливали добавлением Na₂-EDTA до концентрации 20 мМ, ДНК осаждали этиловым спиртом из 0,3 М ацетата натрия, осадок промывали спиртом, высушивали на воздухе и растворяли в 25 мкл стерильной воды. 5 мкл полученного раствора использовали для электрофоретического анализа в 1% агарозном геле (контроль сшивки), а остатком трансформировали клетки *E. coli*, обработанные CaCl₂, как описано ранее [16].

Следующие фрагменты и векторные части были использованы при конструировании плазмид. Плазмида pDS381 – *PstI/EcoRI*-фрагмент ДНК pIF6/8 [17], содержащий начало гена *bla* и промотор P_{VIII} с укороченным геном VIII, *EcoRI*-фрагмент ДНК pDS11₀²⁺ [18] и *PstI/EcoRI*-векторная часть плазмиды pDS11₀²⁺. Трансформанты отбирали по устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу (концентрация антибиотиков 50 мкг/мл каждого). pDS280 – аналогично pDS381, но *PstI/EcoRI*-фрагмент был выделен из ДНК pSK280.1 [21]. pDS1623 – *BspI*-фрагмент ДНК бактериофага M13mp7 длиной 1623 п. о. и лицеваризованную рестриктазой *XhoI* ДНК вектора pDS11₀²⁺, причем *XhoI*-конец достраивали ДНК-полимеразой А в присутствии четырех dNTP при концентрации 100 мМ каждого. Отбор рекомбинантной плазмиды проводили как указано для pDS381. p381IFN – *PstI*-фрагмент ДНК pIF6/8 [17], содержащий начало гена *bla*, промотор P_{VIII} с укороченным геном VIII, N-концевую часть гена IFN вместе с синтетическим участком SD (перед сайтом SD расположены терминаторы трансляции во всех трех рамках считывания) [17], *PstI/EcoRI*-адаптер (структуру адаптера см. в подписи к рис. 3) в виде двух комплементарных синтетических олигонуклеотидов длиной 30 и 38 нуклеотидных остатков и *PstI/EcoRI*-векторная часть плазмиды pDS11₀²⁺. Отбор трансформантов осуществляли по устойчивости к 50 мкг/мл ампициллина. p280IFN и p1623IFN – *PstI/EcoRI*-фрагменты ДНК pDS280 и pDS1623 соответственно и *PstI/EcoRI*-векторная часть плазмиды p381IFN. Отбор трансформантов проводили как указано для p381IFN.

Анализ продуктов, кодируемых плазмидами. а) Определение устойчивости к хлорамфениколу. Ночную культуру плазмидосодержащего штамма *E. coli* разбавляли в 50 раз (до 50 мкл) свежей средой LB и добавляли ампициллин до концентрации 50 мкг/мл и хлорамфеникол до концентрации 5–300 мкг/мл. В тех случаях, когда штамм *E. coli* не содержал плазмиды, ампициллин не добавляли. Клетки выращивали с аэрацией на воздушной качалке (100 об/мин) в течение 5–6 ч при 37° С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты клеточной суспензии, определяли поглощение при 550 нм. На основании этих измерений рассчитывали скорости роста плазмидосодержащего штамма при различных концентрациях хлорамфеникола. За величину устойчивости к хлорамфениколу принимали концентрацию антибиотика, при которой скорость роста штамма составляла половину от скорости роста в отсутствие хлорамфеникола. Для каждого плазмидосодержащего штамма проводили несколько (не менее трех) независимых выращиваний при различных концентрациях хлорамфеникола и по результатам этих экспериментов рассчитывали величину устойчивости к антибиотику для каждого опыта. В таблице (см. выше) приведены усредненные цифры. Найдено: клетки *E. coli* С600 без плазмиды прекращают расти при концентрации хлорамфеникола 5 мкг/мл; скорость роста клеток с плазмидой pDS11₀²⁺ при концентрации хлорамфеникола 10 мкг/мл уменьшается в 2 раза по сравнению со скоростью роста в отсутствие антибиотика, а при концентрации хлорамфеникола 50 мкг/мл рост такого штамма полностью прекращается; данные по штаммам с плазмидами pDS381, pDS280, pDS1623 и pIF6/8 приведены в таблице.

б) Определение интерферона. Клетки *E. coli* SG20050, содержащие плазмиды pDS280, pDS1623, pDS381, pIF6/8, p381IFN, p1623IFN и p280IFN, выращивали в среде LB с ампициллином (50 мкг/мл) до плотности ~10⁹ клеток/мл. Биомассу из 0,5 мл клеточной суспензии собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 4° С, 2 мин), подсушивали и ресуспендировали в 100 мкл лизисного буфера (5% глицерин, 3% додецилсульфат натрия, 2% 2-меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий). Пробу выдерживали 10 мин при 100° С и по 2 или 5 мкл наносили на 12,5% ПААГ (соотношение метиленабисакриламида и акриламида было 1:30). Электрофорез и окрашивание геля проводили как указано в работе [16], используя прибор фирмы Bio-Rad (США). Относительное содержание интерферона в лизатах определяли с помощью сканирования соответствующих дорожек геля на лазерном денситометре Ultroscan XL (ЛКВ, Швеция). Параллельно электрофорезу образцы клеточных лизатов (см. выше) использовали для радиоиммунологического анализа (РИА) лейкоцитарного интерферона α2 человека. Пробы для РИА готовили путем 100-кратного разбавления лизатов в растворе 5 М мочевины, содержащей 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0. Количество интерферона α2 определяли относительно стандартного препарата высокоочищенного рекомбинантного интерферона α2 человека (удельная активность 1,6·10⁸ МЕ/мг), как описано в работе [17].

1. Remaut E., Stanssens P., Fiers W. // Gene. 1981. V. 83. № 1. P. 81-93.
2. Amann E., Brosius J., Ptashne M. // Gene. 1983. V. 25. № 2/3. P. 167-178.
3. Shirakawa M., Tsurimoto T., Matsubara K. // Gene. 1984. V. 28. № 1. P. 127-132.
4. Remaut E., Stanssens P., Fiers W. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 9. P. 4677-4698.
5. Simons G., Remaut E., Allet B., Devas R., Fiers W. // Gene. 1984. V. 28. № 1. P. 55-64.
6. Iserentant D., Fiers W. // Gene. 1980. V. 9. № 1. P. 1-12.
7. Cone K. C., Steege D. A. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 4. P. 733-742.
8. Yanofsky C., Horn V., Bonner M., Stasiowski S. // Genetics. 1971. V. 69. № 2. P. 409-433.
9. Oppenheim D. S., Yanofsky C. // Genetics. 1980. V. 95. № 4. P. 785-795.
10. Yates J. L., Nomura M. // Cell. 1980. V. 21. № 2. P. 517-522.
11. Schümperly D., McKenney K., Sobieski D. A., Rosenberg M. // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 865-871.
12. Baughman G., Nomura M. // Cell. 1983. V. 34. № 3. P. 979-988.
13. Napoli C., Gold L., Singer B. S. // J. Mol. Biol. 1981. V. 149. № 3. P. 433-448.
14. Cone K. C., Steege D. A. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 4. P. 725-732.
15. Машко С. В., Липидус А. Л., Лебедева М. И., Подковыров С. М., Плотникова Т. Г., Козлов Ю. И., Ребенгиш Б. А., Костров С. В., Рыжаская А. С., Стронгин А. Я., Свердлов Е. Д., Дебабов В. Г. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 6. С. 1491-1496.
16. Кравченко В. В., Ямщиков В. Ф., Плетнев А. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 523-533.
17. Гилеев И. П., Мизенко Г. А., Серпинский О. И., Аммосов А. Д., Кравченко В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 3. С. 734-737.
18. Stueber D., Bujard H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 11. P. 1399-1404.
19. Yanofsky C., Platt T., Crawford I. P., Nichols B. P., Christie G. E., Horowitz H., Yanclempur M. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 24. P. 6647-6668.
20. Wezenbeck P., Hulsebos T., Schoenmakers J. // Gene. 1980. V. 11. № 1/2. P. 129-148.
21. Серпинский О. И., Петренко Л. А., Карзинова Е. А., Кравченко В. В. // Метаболические плазмиды. Тез. докл. Таллин, 1982. С. 242.
22. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. С. 152-173.
23. Bujard H., Baldari C., Brunner M., Denschle U., Gentz R., Hughes J., Kammerer W., Stuber D. // Gene amplification and analysis/Eds Papas T. S., Rosenberg M., Chirikjian J. G. // New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1983. V. 3. P. 65-88.
24. Чуупило С. А., Кравченко В. В. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1634-1637.

Поступила в редакцию
31.XII.1986

CONSTRUCTION AND PROPERTIES OF ARTIFICIAL POLYCISTRONS CONTAINING TRUNCATED *E. COLI* TRYPTOPHANE OPERON GENE AND M13 COAT PROTEIN GENE

KRAVCHENKO V. V., GUILÉVA I. P., SHAMIN V. V., KULICHKOV V. A.,
DOBRYNIN V. N.*, FILIPPOV S. A.*, CHUVPILO S. A.*, KOROBKO V. G.*

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region:
* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Using gene fragments encoding the leader peptide of *E. coli* tryptophane operone (as duplicated fragment *HhaI*-140) or M13 phage coat protein (as *TaqI*-381 or *HaeIII*-1623 fragments) and basing on pDS1 family of plasmids, expression vectors have been constructed which contained transcription promoters P_{TRP}, P_{VIII}, and P_V+P_{VIII}, respectively. An artificial gene for human leukocyte interferon $\alpha 2$ (*i/n*- $\alpha 2$) has been cloned into these plasmids, so that its transcription was a part of polycistronic mRNA and preceding translation was terminated upstream to the ribosome binding site and starting codon of the interferon gene. *E. coli* cells harbouring these recombinant plasmids provided high level of the interferon biosynthesis. The effect of the mRNA length on the amount of protein synthesised under control of the M13 coat protein transcription-translation signals has been found.