БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 14 * № 2 * 1988

УДК 547.963.32.04

НОВЫЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Гуревич А. И., Некрасова О. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Получена серия плазмид pFPCP, содержащих полный ген основного белка оболочки нитчатых фагов или его регуляторные элементы и встроенные в этот ген уникальные сайты рестриктаз.

Ген VIII нитчатых фагов (fd, M13) характеризуется рядом особенностей, которые делают его весьма привлекательным элементом при конструировании новых векторных систем. Этому гену в фаговом геноме предшествует сильный промотор, транскрипция с которого обрывается в эффективном терминаторе, расположенном вслед за геном VIII [1]. Высокая эффективность трансляции гена VIII обусловлена оптимальной для инициаторной тРНК структурой мРНК UUCCUCAUGAAA вблизи стартового кодона (подчеркнуты участки связывания тРНК) [2]. Наконец, продукт гена VIII представляет собой основной белок оболочки нитчатых фагов (fpcp). В процессе трансляции он образуется в виде полипептида, содержащего лидерную последовательность, наличие которой приводит к транспорту его в периплазматическое пространство клетки *E. coli*. Благодаря этому fpcp избегает протеолиза внутри клетки и после процессинга зрелый белок накапливается в периплазме в количестве более 10^6 копий [3]. Таким образом, введение в векторную систему структуры гена *fpcp* или его элементов делает возможным достижение высокой экспрессии клонируемого гена либо непосредственно, либо в виде гибрида с *fpcp*.

С этой целью мы сконструировали серию плазмид pFPCP, содержащих весь ген *fpcp* или его регуляторные участки (рис. 1).

Фрагмент RF ДНК фага fd, содержащий ген VIII, вырезанный с помощью рестриктазы *Taq*XI [4], мы далее расщепили рестриктазой *Bsp*I, сайт которой в гене VIII (нуклеотиды 1396–1399 [1]) расположен на расстоянии 27 п.о. за точкой, отвечающей месту процессинга fpcp. Полученный фрагмент *Taq*XI/*Bsp*I-382 после достройки выступающего в одной из нитей конца с помощью полимеразы А был сшит с 5′-фосфорилированным самокомплементарным линкером dpATCCGAATTCGGAT и, наконец, гидролизован рестриктазой *Eco*RI. Выделенный затем после электрофореза в ПААГ фрагмент клонировали в *Eco*RI-сайте плазмиды pBR322mpt5 [5], в которой делетирован промотор гена *tet*, отбирая рекомбинанты с нужной ориентацией встроенного фрагмента по восстановлению фенотипа Tc^R. В результате мы получили плазмиду pFPCP1, в которой перед геном *tet* имеются участки промотора, инициации трансляции и гена VIII, кодирующего лидерный пептид и начало зрелого белка оболочки, а на месте сайта *Bsp*I в гене VIII имеется полилинкерная последовательность сайтов рестриктаз *Bam*HI, *Eco*RI и *Kpn*I (рис. 1 и 2).

Для расширения векторных возможностей полилинкера мы уничтожили один из двух сайтов *Eco*RI плазмиды pFPCP1 путем ограниченного гидролиза этой рестриктазой, достройки выступающих концов с помощью полимеразы А и, наконец, циклизации. Последующее клонирование привело к получению плазмиды pFPCP2; отбор клонов проводили по результатам рестриктного анализа (*Eco*RI/*Msp*I).

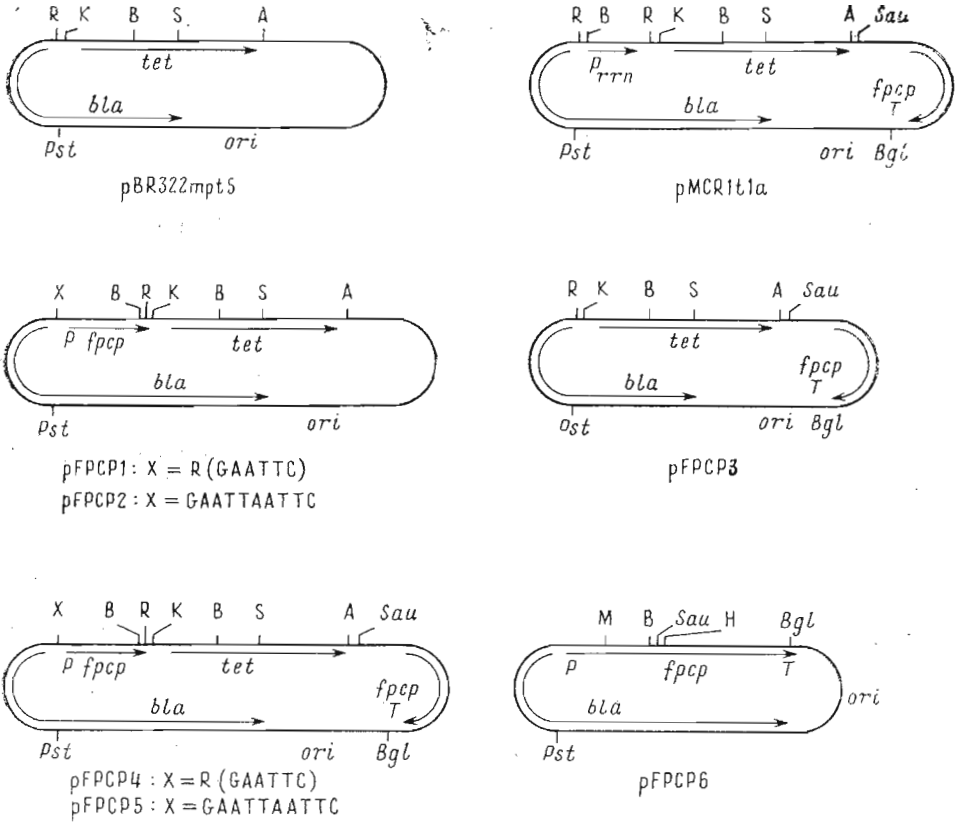

Рис. 1. Схематическое строение плазмид серии pFPCP. Указано расположение сайтов рестриктаз (R — *Eco*RI, K — *Kpn*I, B — *Bam*HI, S — *Sal*I, A — *Ava*I, *Sau* — *Sau*3AI, *Bgl* — *Bgl*II, M — *Msp*I, H — *Hin*II, *Pst* — *Pst*I), точки начала репликации — *ori*; направление транскрипции генов и расположение промоторов (P) и терминатора (T)

Для конструирования плазмиды, содержащей все структурные элементы гена VIII, мы исходили из ранее полученной нами многокопийной плазмиды pMCR1t1a [7], в которой структурному гену *tet* предшествует промотор *rrn*B, расположенный между двумя сайтами *Eco*RI, а за сайтом *Ava*I следует структурный ген *fpcp* (начиная с нуклеотида 1382 последовательности фага fd) и фаговый терминатор (рис. 1). В этой плазмиде участок промотора *rrn*B мы удалили с помощью рестриктазы *Eco*RI и в полученную Tc^S-плазмиду pFPCP3 встроили описанный выше фрагмент *Taq*XI/*Bsp*I-382, снабженный *Eco*RI-линкерами. Это привело к Tc^R-плазмиде pFPCP4, в которой начальный и концевой участки гена *fpcp* разделены геном *tet* (см. рис. 1 и 2). В этой плазмиде подобно pFPCP2 мы уничтожили один из двух сайтов *Eco*RI, превратив ее в pFPCP5. Наконец, участок гена *tet* мы делетировали с помощью рестриктаз *Ava*I и *Eco*RI. В полученной таким образом плазмиде pFPCP6 содержатся все элементы гена *fpcp*, в начальной части структурного гена которого встроен уникальный сайт рестриктазы *Bam*HI.

Структура плазмид доказана секвенированием соответствующих *Eco*RI/*Msp*I- или *Hin*fI/*Msp*I-фрагментов (см. рис. 1 и 2).

Таким образом, мы получили серию плазмид, использованных нами впоследствии для клонирования и экспрессии генов белков и пептидов, содержащих полный ген *fpcp* или его регуляторные элементы и встроенные в этот ген уникальные сайты рестриктаз.

Следует отметить, что плазмида pFPCP6 оказалась неустойчивой и склонной к спонтанным делециям участков ДНК вблизи повтора в районе сайта *Bam*HI (см. рис. 2). Однако после вставки в этот сайт клонируемого фрагмента она снова становилась устойчивой.

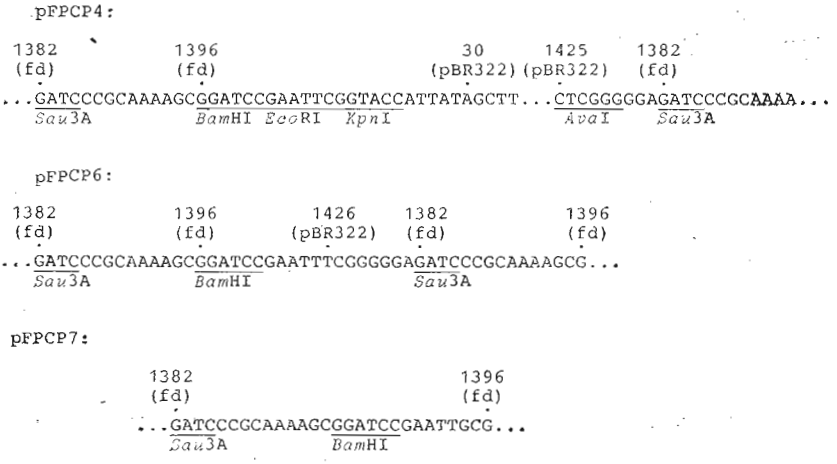

Рис. 2. Фрагменты нуклеотидных последовательностей плазмид pFPCP4, pFPCP6 и pFPCP7. Указаны сайты расщепления рестриктазами и номера нуклеотидов гена VIII фага fd [1] и нуклеотидов вектора pBR322 [6]. Плазмида pFPCP7 образовалась из pFPCP6 в результате спонтанной делеции

Авторы выражают благодарность В. Н. Добрынину за синтетический линкер и студенту МФТИ А. В. Микульскису за помощь в работе.

Экспериментальная часть

Использовали трис, акриламид, N,N′-метиленбисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (Reanal); агарозу, ATP, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевину, ос.ч., CsCl, ос.ч. (Союзреактив); [γ-^{32}P]ATP, [α-^{32}P]dNTP (1500–2000 Ки/ммоль) (Amersham); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco). Тетрадекануклеотид dATCCGAATTCGGAT получен от В. Н. Добрынина (ИБХ АН СССР).

Т4-ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1), Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78), ДНК-полимераза А (КФ 2.7.7.7) и рестрикционные эндонуклеазы (КФ 3.1.23.×) *Eco*RI, *Bam*HI, *Taq*XI и *Ava*I выделены и очищены, как описано в работе [7]. Рестрикционные эндонуклеазы *Bsp*I (Reanal), *Msp*I (Институт прикладной энзимологии, Вильнюс), *Hin*fI (PL Biochemicals).

5′-Концевую метку вводили по методу [8], 3′-концевую метку – по методу [9]. Для секвенирования ДНК использовали частичную химическую деградацию твердофазным методом [10]. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах ПААГ (5–15%) толщиной 0,4 мм в 50 мМ трис-боратном буфере (pH 8,3) или в горизонтальных пластинах 1% агарозного геля толщиной 2 мм в буфере (pH 8,0), содержащем 40 мМ трис-ацетат, 20 мМ NaOAc, 20 мМ NaCl и 1 мМ EDTA. Радиоавтографы получали на рентгеновской пленке РМ-1, используя при низкой радиоактивности образцов усиливающие экраны ЭУ-В3. Выделение ДНК из агарозных гелей проводили методом электроэлюции [11].

Сшивку с синтетическим самокомплементарным линкером проводили в буфере, содержащем 66 мМ трис-HCl, 7 мМ $MgCl_2$, 10 мМ дитиотреит, 0,5 мМ ATP (pH 8,0) при 20° С (20 ч), при концентрации Т4-ДНК-лигазы 1 ед. акт./мкл, концентрации линеаризованной плазмиды 0,01 пмоль/мкл и 100-кратном избытке тетрадекануклеотида. Встраивание клонируемых фрагментов в *Eco*RI-сайт плазмид проводили при 10° С (20 ч), концентрации Т4-ДНК-лигазы 1 ед. акт./мкл, фрагмента 0,1 пмоль/мкл и плазмиды – 0,05 пмоль/мкл. Циклизацию линеаризованных плазмид с затупленными концами проводили при 22–23° С (20 ч), концентрации Т4-ДНК-лигазы 1 ед. акт./мкл и плазмиды – 0,01 пмоль/мкл.

Компетентные клетки *E. coli* HB101 или TG1 готовили по методу [12] и хранили при –50° С. После трансформации в условиях, приведенных в работе [12], клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей 100 мкг/мл ампициллина или 20 мкг/мл тетрациклина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schaller H., Beck E., Takanami M.* // The Single-stranded DNA Phages / Eds Denhardt D. T., Dressler D., Ray D. S. Cold Spring Harbor, 1978. P. 139–163.
2. *Ganoza M. C., Marliere P., Kofoid E. C., Louis B. G.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 14. P. 4587–4591.
3. *Moses P. B., Horiuchi K.* // Virology. 1982. V. 119. № 2. P. 231–244.

4. *Грачев С. А., Мамаев С. В., Гуревич А. И., Игошин Л. В., Колосов М. Н., Слюсаренко А. Г.* // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 628–630.
5. *Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Чувпило С. А., Северцова И. В., Шингарова Л. Н., Колосов М. Н.* // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 2. С. 309–312.
6. *Sutcliffe J. G.* // C. S. H. Symp. Quant. Biol. 1978. V. 43. P. 77–90.
7. *Гуревич А. И., Бабий Н. И., Некрасова О. В., Черненькая Е. А., Колосов М. Н.* // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1356–1360.
8. *Махат А. М., Gilbert W.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560–564.
9. *Гуревич А. И., Аваков А. Э.* // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 2. С. 301–304.
10. *Чувпило С. А., Кравченко В. В.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1634–1637.
11. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* // Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. С. 171–172.
12. *Morrison D. A.* // Meth. Enzymol. 1979. V. 68. P. 321–331.

Поступила в редакцию
30.III.1987

NOVEL PLASMID VEHICLES FOR GENE CLONING AND EXPRESSION

GUREVICH A. I., NEKRASOVA O. V.

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

Plasmids of the pFPCP series have been constructed, containing the whole gene for the filamentous phage main coat protein or its regulatory elements along with unique restrictase sites.