



УДК 577.21

ПЛАЗМИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДВА НОВЫХ ВАРИАНТА ГЕНА
lacZ *E. COLI*Худяков Ю. Е., Калинин Т. И., Неплюева В. С.,
Смирнов В. Д.Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Академии медицинских наук СССР,
Москва

Описаны плазмиды, образовавшиеся в результате спонтанного делеционного процесса. Делеции размером 1,8–2 т. п. о. локализованы в N-концевой части гибридного гена *cro-lacZ*, содержащегося в составе исходной плазмиды pCL471. Несмотря на отсутствие ~60% последовательности гена *lacZ*, новые гибридные плазмиды обеспечивают трансформированным клеткам способность к проявлению ферментативной активности β-галактозидазы.

Одной из важных проблем генетической инженерии является перестраивание структуры гибридных плазмид в трансформированных клетках бактерий. Нуклеотидная последовательность плазмид может быть изменена в результате встраивания IS-элементов, дупликации отдельных участков ДНК [1] и т. д. Однако чаще всего в составе гибридных плазмид происходит образование делеций. В некоторых случаях этот процесс носит сайтспецифический характер [2, 3]. К сожалению, несмотря на довольно частое появление делеционных производных плазмид в ходе генно-инженерных экспериментов, в литературе подробно описана организация только небольшого числа этих структур. Ни причины, ни механизм перестраивания рекомбинантных ДНК в бактериальных клетках детально не изучены.

Нами в ходе работы, направленной на модификацию плазмиды pCL471, обнаружены плазмиды, в составе которых спонтанно делетирована последовательность размером 1,8–2 т. п. о. Полученные делеционные производные содержат два новых варианта гена *lacZ*.

Плазмида pCL471 отличается от pCL47 [4] только отсутствием одного *EcoRI*-сайта, располагающегося перед P_R -промотором фага λ, под контролем которого находится гибридный ген *cro-lacZ* [4]. Белок, кодируемый гибридным геном pCL47, обладает активностью β-галактозидазы. При температурной инактивации *c1857*-репрессора в клетках *E. coli* K12ΔH1Δ*trp*, трансформированных pCL47, происходит высокоэффективный синтез этого фермента. Через 2 ч после индукции P_R -промотора гибридный полипептид составляет 15,9% от всех синтезируемых белков [4].

В наших экспериментах мы использовали плазмиду pCL471 для изменения структуры зоны инициации трансляции гибридного гена *cro-lacZ*. Для этого pCL471 гидролизовали рестриктазой *Bam*HI, участок узнавания которой разделяет кодирующие зоны *cro* и *lacZ*. Затем ДНК обрабатывали нуклеазой *Bal*31, чтобы удалить не более 15–20 п. о. в каждую сторону от точки расщепления. Восстановление кольцевой формы плазмид проводили либо с применением *Bam*HI-линкера (плазмиды pCL1N), либо без использования линкера (плазмиды pCL2N). Полученной смесью ДНК трансформировали клетки *E. coli*. Для дальнейшего анализа отбирали среды трансформантов только клоны бактерий, обладающие ферментативной активностью β-галактозидазы. К нашему удивлению, наряду с плазмидами, близкими по размеру к pCL471 (~6 т. п. о.), из бактерий, имеющих фенотип *lacZ*⁺, были выделены «мяши»-плазмиды: pCL210, pCL217, pCL236, pCL243 и pCL115, содержащие 4–4,5 т. п. о.

С использованием ферментов *Msp*I, *Taq*I, *Bam*HI и *Eco*RI был прове-

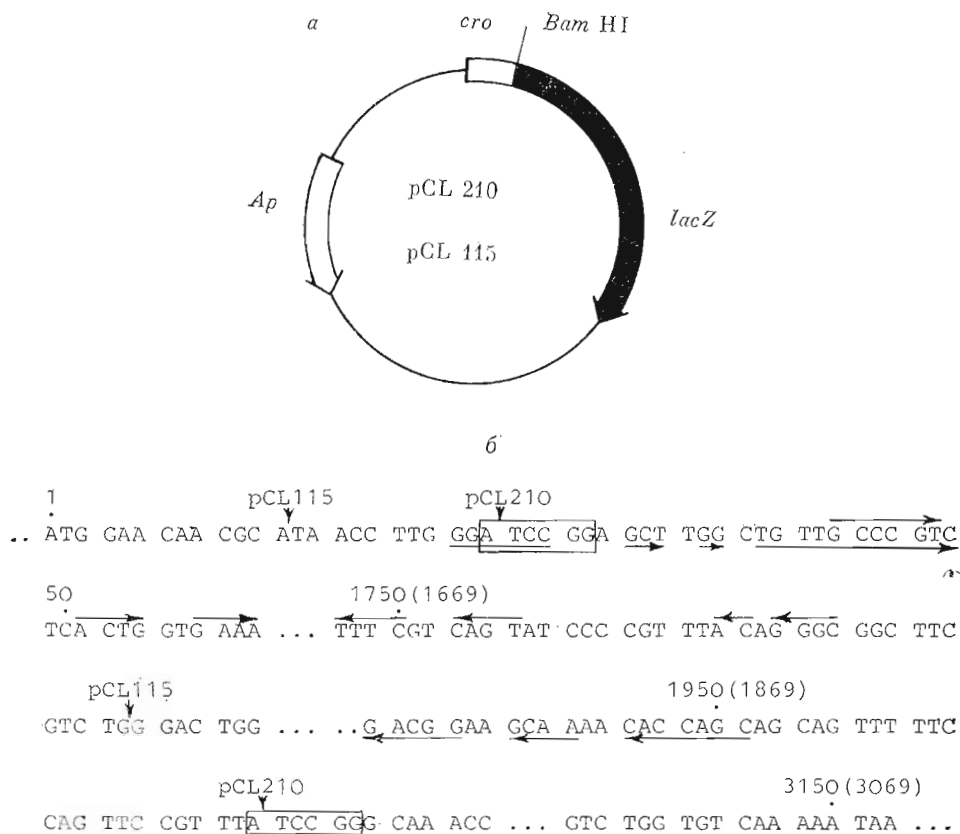


Рис. 1. Структура плазмид pCL210 и pCL115. а — генетическая организация; б — последовательность нуклеотидов кодирующей зоны гибридного гена *cro-lacZ* плазмиды pCL471. Вертикальными стрелками указаны границы делеций в плаزمиде pCL115 и pCL210. Подчеркнут участок узнавания *Bam*HI. В рамку заключены гомологичные участки на границе делеции у плазмиды pCL210. Взаимокомплементарные участки в концевых областях делетированных последовательностей плазмиды pCL210 отмечены горизонтальными стрелками под строкой, для pCL115 — над строкой. Приведена сквозная нумерация нуклеотидов всей кодирующей зоны *cro-lacZ*, в скобках указана нумерация нуклеотидов гена *lacZ*, принятая в работе [5]

ден рестрикционный анализ этих плазмид. В результате было установлено, что «миши»-плазмиды образовались в результате делеции из плазмиды pCL471 протяженного участка ДНК, составляющего ~60% гибридного гена *cro-lacZ*. При этом, по данным рестрикционного анализа, плазмиды pCL210, pCL217, pCL236 и pCL243 идентичны.

Более точно границы делеций установили путем определения первичной структуры участка ДНК, охватывающего *Bam*HI-сайт. Оказалось, что у плазмид pCL210, pCL217, pCL236 и pCL243 гибридный ген представлен сохранившейся от pCL471 зоной *cro* и С-концевой частью гена *lacZ* (начиная с 1894-й п.о. согласно нумерации [5]). В плазмиде pCL115 кодирующая зона его сокращена, а область *lacZ* представлена с 1704-й п.о. Участки *cro* и *lacZ* плазмиды pCL115 соединены между собой последовательностью *Bam*HI-лишкера (рис. 1).

Важная особенность полученных делеционных производных плазмиды pCL471 — сохранение *Bam*HI-сайта, который располагается непосредственно на границе образовавшихся делеций несмотря на то, что именно этот участок подвергался интенсивной ферментативной обработке *in vitro*. Ясно, что источником делеций являются не линейные молекулы ДНК, так как в этом случае кажется маловероятной возможность сохранения *Bam*HI-сайта. Структура pCL115 свидетельствует, что делеции могли образоваться *in vitro* в результате проявления каких-то сопутствующих активностей в препаратах ферментов *Bam*HI или *Bal*31, т. е. до присоеди-

нения *VamHI*-линкара, либо *in vivo* уже после восстановления кольцевой формы плазмиды с помощью ДНК-лигазы фага Т4. Если механизм образования делеций у плазмид pCL210 и pCL115 одинаков, то удаление протяженных участков ДНК должно было произойти *in vivo*. Так как одна из границ делеции располагается в непосредственном приближении к *VamHI*-сайту плазмид, можно предположить, что какие-то особенности этого участка провоцируют делеционный процесс, причем скорее всего они введены *in vitro*, поскольку сама плазида pCL471, а также другие делеционные производные, полученные в ходе описанных экспериментов в результате обработки *Bal31* и сохраняющие *VamHI*-сайт, достаточно стабильны. При длительном культивировании не было отмечено ни одного случая образования делеций в этих плазидах. Возможно, молекулы ДНК, являющиеся предшественниками pCL210 и pCL115, содержали однонитевой разрыв, сохранившийся при обработке ДНК-лигазой «липких» *VamHI*-концов.

Первичная структура предшественников «мини»-плазмид неизвестна, так как трансформацию клеток бактерий проводили смесью молекул ДНК, обработанных *Bal31*. Для плазмид pCL210, pCL217, pCL236 и pCL243, однако можно предположить, что они произошли из pCL471. Благодаря мягким условиям обработки нуклеазой *Bal31* трансформирующая смесь молекул ДНК содержала значительное число молекул исходной плазмиды pCL471, о чем свидетельствуют результаты рестрикционного анализа плазмид, выделенных из трансформированных клеток *E. coli*. Видимо, поэтому нам удалось обнаружить сразу четыре идентичные «мини»-плазмиды, образовавшиеся, очевидно, в результате сайтспецифического процесса.

Ранее было продемонстрировано, что на границах протяженных, спонтанно образовавшихся делеций располагаются, как правило, короткие гомологичные участки ДНК, которые, возможно, играют важную роль в механизме «выщепления» делетируемых последовательностей [3, 6]. При анализе первичной структуры ДНК pCL471 были обнаружены гомологичные гексануклеотидные участки, располагающиеся на границе делеций плазмид pCL210, pCL217, pCL236 и pCL243. Мало того, удалось установить, что в непосредственной близости от этого короткого повтора располагаются взаимокomплементарные участки (обращенные повторы), которые могут образовывать шпильку в молекуле ДНК. Существует предположение, что такого рода шпильчатые структуры пространственно сближают удаленные гомологичные участки ДНК, способствуя тем самым образованию больших делеций [3]. Хотелось бы отметить, что концевые участки делетируемых последовательностей ДНК по общей организации напоминают соответствующие области транспозонов, которые содержат как прямые, так и инвертированные концевые повторы [7]. Как предполагают авторы работы [3], процесс образования протяженных делеций ДНК напоминает эксцизию транспозонов.

Для предшественника плазмиды pCL115 невозможно предсказать точную первичную структуру, поэтому неясно, существовали ли прямые повторы на границе образовавшейся делеции. Однако и в этом случае в концевых участках делетируемых фрагментов ДНК выявлены комплементарные последовательности, которые могут образовать шпильчатую структуру (рис. 1).

Другая интересная особенность «мини»-плазмид — способность обеспечивать фенотип *lacZ*⁺ трансформированным клеткам *E. coli*, несмотря на то что в составе плазмид сохранена только С-концевая часть гена β-галактозидазы (~40% всего гена *cro-lacZ*). Согласно установленной нами нуклеотидной последовательности, плазмиды pCL210, pCL217, pCL236 и pCL243 содержат гибридный ген *cro-lacZ*, кодирующий полипептид, состоящий из 400 аминокислотных остатков, тогда как плазида pCL115 должна детерминировать синтез гибридного белка, содержащего 463 аминокислотных остатка. При анализе экстрактов клеток, трансформированных «мини»-плазидами, были обнаружены белки ожидаемого размера, при этом синтез данных белков строго зависел от температурной индукции *P_R*-промотора (рис. 2). После электрофореза в ПААГ меченных

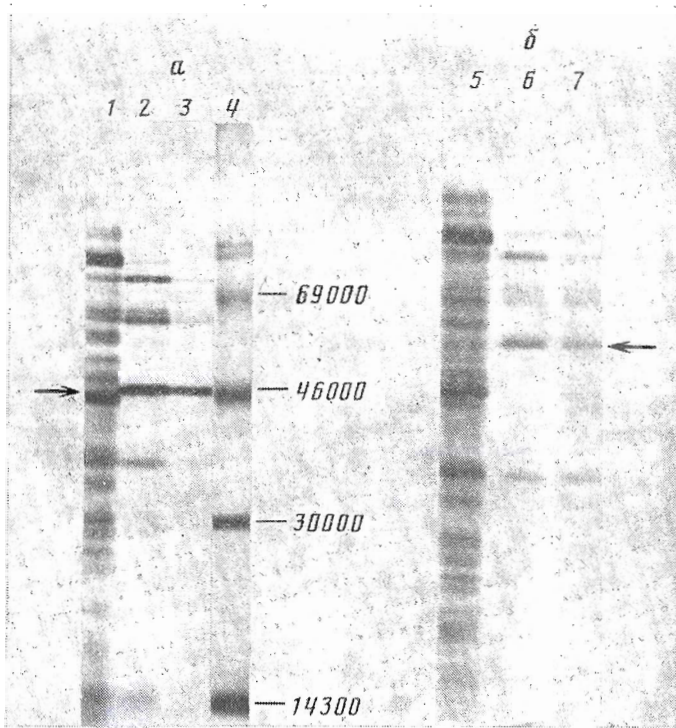


Рис. 2. Электрофоретический анализ (10% ПААГ) белков, синтезирующихся в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидами рСL210 (а) и рСL115 (б). 1, 5 — белки клеток, выращенных при 30° С; белки, синтезирующиеся через 1 ч (2 и б) и 2 ч (3, 7) после температурной индукции P_H -промотора, 4 — маркеры молекулярной массы. Стрелками указаны гибридные полипептиды, кодируемые «мини»-плазмидами

[^{35}S]метионином клеточных белков и автордиографии провели денситометрирование автордиограмм. Установили, что «мини-плазмиды детерминируют по крайней мере в ~ 3 раза более эффективный синтез гибридных белков, чем рСL471. Причины столь высокого уровня синтеза гибридных белков, а также проявления ферментативной активности β -галактозидазы в клетках, трансформированных «мини»-плазмидами, неизвестны. Не исключено, что эта активность проявляется по механизму ω -комплементации, описанному для β -галактозидазы [8], так как известно, что использованные в работе клетки *E. coli* K12 $\Delta\text{HI}\Delta\text{trp}$ могут синтезировать N-концевую часть полипептида, кодируемого геном *lacZ* [9]. Повышенный уровень продукции, возможно, обеспечивается большей устойчивостью гибридных белков к действию внутриклеточных протеиназ. Другой причиной может служить удаление при образовании делеций внутрицистронного терминатора транскрипции, локализованного в центре *lacZ* и существенно влияющего на эффективность синтеза β -галактозидазы [10].

Векторные системы, построенные на основе гена *lacZ*, широко используются как для клонирования фрагментов ДНК [11], так и для экспрессии чужеродной генетической информации в бактериях [12]. Недавно было продемонстрировано, что плазмиды, содержащие неполные гены *lacZ*, являются эффективными векторами экспрессии [13]. Очевидно, описанные нами «мини»-плазмиды также могут быть использованы в качестве прототипных конструкций для создания новых векторов.

Экспериментальная часть

В работе использовали штамм *E. coli* K12 $\Delta\text{HI}\Delta\text{trp}$ (M72 Sm^r *lacZ-am bio-uvrBt-trpEA2* (λNam7 , Nam53 , $\text{c1857}\Delta\text{HI}$)) [9]; рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *BamHI*, *MspI*, *TaqI* и *BspRI* производства НПО «Фермент» (Вильнюс); Т4-ДНК-лигазу

и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы Boehringer (ФРГ); [α - 32 P]dNTP (3000 Ки/ммоль), [γ - 32 P]ATP (5000 Ки/ммоль) и [35 S]метионин (800 Ки/ммоль) фирмы Amersham (Англия). Нуклеаза *Bal31* получена от В. Н. Калинина (Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва).

Обработка ДНК нуклеазой *Bal31*. Из клеток *E. coli* плазмиды выделяли методом «кипячения» [14]. ДНК, гидролизованную *Bam*HI, инкубировали при 16° С в буфере, содержащем 12 мМ CaCl₂, 12 мМ MgCl₂, 0,2 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 1 мМ EDTA. Время инкубации и концентрацию фермента *Bal31* подбирали в предварительных экспериментах. Реакцию останавливали добавлением раствора EGTA до конечной концентрации 20 мМ. Скорость реакции контролировали следующим образом: через равные промежутки времени отбирали аликвоты ДНК и метили с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) и смеси [α - 32 P]dNTP, меченые образцы гидролизовали *Bsp*RI, продукты расщепления фракционировали электрофорезом в 8% ПААГ. О скорости реакции судили по изменению размера меченых фрагментов ДНК.

Присоединение синтетического *Bam*HI-линкера. Использовали синтетический линкер со структурой dCCGGATCCGG. Раствор олигонуклеотида (500 пмоль) в 10 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 9,0), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 2 пмоль [γ - 32 P]ATP и 1 ед. акт. Т₄-полинуклеотидкиназы, инкубировали 16 ч при 5° С. Затем добавляли ATP до 0,1 мМ, 3 ед. акт. Т₄-полинуклеотидкиназы и инкубировали при 37° С еще 30 мин. Далее реакционную смесь использовали без выделения фосфорилированного линкера: 100 пмоль линкера смешивали с 0,2 мкг ДНК, обработанной *Bal31* и ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова), и инкубировали 16 ч при 20° С в буфере, содержащем 25 мМ трис-HCl (pH 7,4), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 0,5 мМ ATP и 10 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т₄. Полученный препарат прогревали 10 мин при 65° С и обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *Bam*HI. Полноту гидролиза олигомерных форм линкера контролировали с помощью электрофореза в 20% ПААГ.

Клонирование. Для восстановления кольцевой формы плазмид, обработанных *Bal31*, ДНК (0,2 мкг) инкубировали 16 ч при 14° С в 100 мкл буфера, использованного ранее для присоединения линкера, добавив 10 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т₄. Трансформацию и приготовление компетентных клеток *E. coli* проводили как описано в работе [15]. Трансформанты высевали на чашки с агаром МакКонки, содержащим 50 мкг/мл ампициллина, либо на LB-агар, содержащий 50 мкг/мл ампициллина и 40 мкг/мл X-Gal. Для дальнейшего анализа отбирали только клоны бактерий, обладающие красной окраской на агаре МакКонки, или голубые колонии на среде с X-Gal.

Анализ структуры плазмид. Все плазмиды подвергали рестрикционному анализу. Плазмидную ДНК расщепляли рестриктазами *Msp*I или *Taq*I. Часть полученного препарата обрабатывали *Bam*HI, чтобы выявить фрагменты ДНК, содержащие участок узнавания этой рестриктазы. Продукты расщепления разделяли в 8% ПААГ. В качестве контроля во всех экспериментах по рестрикционному анализу использовали исходную плазмиду pSL471. Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили по методу Максама — Гилберта [16]. Для этого плазмиды гидролизовали *Bam*HI, с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) и [α - 32 P]dATP вводили концевую метку. После обработки меченого препарата ДНК *Taq*I продукты расщепления фракционировали в 8% ПААГ. Фрагменты ДНК выделяли из ПААГ как описано в работе [16].

Анализ продуктов экспрессии гибридных генов плазмид. Индукцию *P_R*-промотора проводили согласно [9]. Клетки выращивали в среде M9 [17] с добавлением казаминовых кислот до 0,5% и ампициллина до 50 мкг/мл. Через 2 ч после активации промотора отбирали 200 мкл клеточной суспензии, к которой добавляли 20 мкг [35 S]метионина, и инкубировали 10 мин при 42° С. Затем клетки собирали центрифугированием. Меченые белки клеток разделяли в 10% ПААГ по Лэммли [18]. Если автордиограммы гелей предполагали сканировать, то наносимые образцы стандартизировали по 35 S-метке. В качестве маркеров молекулярной массы использовали смесь 14 C-метилированных белков фирмы Amersham (Англия). Денситометрирование автордиограмм проводили с помощью прибора Chromoscan 200 Joyce Loebl. В каждом случае рассчитывали содержание гибридного полипептида, кодируемого плазмидами, относительно всех меченых белков клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Худяков Ю. Е., Лопарева Е. Н., Лукин В. Г., Смирнов В. Д., Тихоненко Т. И. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. 1984. № 9. С. 37—41.
2. Garaev M. M., Bobkov A. F., Bobkova A. F., Kalinin V. N., Sмирнов V. D., Khudyakov Yu. E., Tikhonenko T. I. // Gene. 1982. V. 18. № 1. P. 21—28.
3. Albertini A. M., Hofer M., Calos M. P., Miller J. H. // Cell. 1982. V. 29. № 2. P. 319—328.
4. Zabeau M., Stanley K. K. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 1217—1224.
5. Kalnins A., Otto K., Ruther U., Muller-Hill B. // EMBO J. 1983. V. 2. № 4. P. 593—597.
6. Efstratiadis A., Posakony J. W., Maniatis T., Lawn R. M., O'Connell C., Spritz R. A., DeRiel J. K., Forget B. G., Weissman S., Slighton J. L., Blechl A. E., Smithies O., Baralle F. E., Sgoulders C. C., Proudfoot N. J. // Cell. 1980. V. 21. № 2. P. 653—668.
7. Calos M. P., Miller J. H. // Cell. 1980. V. 20. № 2. P. 579—595.

8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. С. 142–147.
9. Bernard H.-U., Remaut E., Hershfield M. V., Das H. K., Helinski D. R., Yanofsky C., Franklin N. // *Gene*. 1979. V. 5. № 1. P. 59–76.
10. Stanssens P., Remaut E., Fiers W. // *Cell*. 1986. V. 44. № 3. P. 711–718.
11. Vieira J., Messing J. // *Gene*. 1982. V. 19. № 2. P. 259–268.
12. Ruther U., Muller-Hill B. // *EMBO J.* 1983. V. 2. № 10. P. 1791–1794.
13. Guo L.-H., Stepien P. P., Tso J. Y., Brousseau R., Narang S., Thomas D. Y., Wu R. // *Gene*. 1984. V. 29. № 1/2. P. 251–254.
14. Holmes D. S., Quigley M. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 114. P. 193–198.
15. Rosteck P. R., Hershberger C. L. // *Gene*. 1983. V. 25. № 1. P. 29–38.
16. Maxam A. M., Gilbert W. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499–560.
17. Маниарус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярные клонирование. М.: Мир, 1984. С. 390.
18. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.

Поступила в редакцию
27.I.1987

После доработки
31.VIII.1987

THE PLASMIDS CONTAINING TWO NEW VARIANTS OF THE *lacZ* GENE OF *E. COLI*

KHUDYAKOV Yu. E., KALININA T. I., NEPLYUEVA V. S., SMIRNOV V. D.

*D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

New plasmids containing partially deleted *lacZ* genes were obtained. These genes determine high-level synthesis of polypeptides of molecular mass 43–45 and 49–51 kD under the control of the lambda phage P_R -promoter; in spite of the deletion, *E. coli* cells carrying new plasmids were found to possess β -galactosidase activity. Use of these plasmids as new expression vectors is suggested.