



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 15 * № 1 * 1989

УДК 577.214.622/625

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОМОТОРПРОБНЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕНА β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

ESCHERICHIA COLI

*Ефимов В. А., Мирских О. В., Бурякова А. А.,
Пашкова И. Н., Полушкин Н. Н., Чахмахчева О. Г.*

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

Для оценки силы природных и синтетических промоторов сконструированы плазмидные векторы, содержащие в качестве гена-маркера модифицированный ген β -галактозидазы *E. coli*, в котором в качестве 5'- и 3'-концевых участков были использованы синтетические фрагменты ДНК. Векторы содержат также последовательности, кодирующие терминаторные участки, а также SD-сайт и полилинкерный участок для введения тестируемых ДНК. С помощью этой промоторпробной системы проведены сравнительный анализ эффективности экспрессии гена β -галактозидазы под контролем ряда синтетических промоторов.

Создание новых векторных систем, удобных для клонирования, секвенирования и экспрессии генов, является одним из основных направлений в современной генетической инженерии. Так, в настоящее время широко известны векторы на основе ДНК бактериофага M13 [1], предназначенные для клонирования и секвенирования фрагментов ДНК, и плазмидные векторы pUC [2], в состав которых входят синтетические полилинкерные участки. Ранее с применением синтетических фрагментов ДНК нами была получена серия плазмид pHS и pPLE [3, 4], представляющих собой удобные для клонирования, проведения мутагенеза и конструирования искусственных генов векторы, а также ряд векторов, предназначенных для экспрессии в *E. coli* генов небольших гетерологичных пептидов и белков [5].

Настоящее сообщение посвящено конструированию плазмидных векторов, пригодных для оценки силы природных и синтетических промоторов на основании определения уровня экспрессии гена-маркера, в качестве которого был выбран хорошо изученный ген β -галактозидазы. Применение хромогенных субстратов этого фермента позволяет не только быстро находить экспрессирующие плазмиды, несущие этот ген, но и измерять с помощью колориметрического анализа уровень синтеза кодируемого им белка [6]. Кроме того, знание первичной структуры β -галактозидазы и ее гена наряду с данными о сохранении ферментативной активности при замене 26 N-концевых и 2 C-концевых аминокислотных остатков любым другим числом остатков аминокислот [7] делает возможным получение генов химерных β -галактозидаз, сохраняющих ферментативную активность.

Нами были сконструированы плазмиды, несущие модифицированный ген β -галактозидазы, а также последовательности, соответствующие рибосомсвязывающему и терминаторным участкам, и полилинкер. Нуклеотидные последовательности синтетических 5'- и 3'-частей гена β -галактозидазы, а также SD-участка и прилегающих к нему слева и справа фрагментов ДНК были спланированы с учетом характера этих последовательностей у гена *lacZ* дикого типа как отработанной в ходе эволюции, сбалансированной системы. Наличие сильного терминатора транскрипции за геном β -галактозидазы должно было приводить к увеличению времени жизни мРНК и обеспечивать стабильность системы, в которой экспрессируется ген-маркер. Для введения в промоторпробную систему исследуемых фрагментов ДНК была предусмотрена полилинкерная последовательность, а перед полилинкером в одном из вариантов промоторпробной си-

стемы вводился второй терминаторный участок для устранения фонового биосинтеза β -галактозидазы и удобства тестирования слабых и средних промоторов.

В качестве исходной для получения модифицированного гена β -галактозидазы послужила плазмида pLZ1 [8], которая содержит основную часть гена lacZ, лишенную 15 начальных и 59 концевых нуклеотидов кодирующей последовательности в виде EcoRI-фрагмента длиной в 3000 п. о., клонированного в векторе pBR322. При гидролизе нуклеазой Clal плазмида pLZ1 дает два фрагмента длиной в 2000 и 5500 п. о., откуда следует, что вставка в ней фрагмента гена lacZ (16–3019) имеет полярность, показанную на рис. 1.

5'-Концевую часть гена lacZ (1–15) собирали из шести 17–19-звенных олигонуклеотидов. Синтетический фрагмент ДНК (108 п. о.), полученный в результате сшивки этих олигонуклеотидов Т4-ДНК-лигазой с одновременным удвоением по XhoI-сайту, вводили в частично расщепленную пуклазой EcoRI плазмиду pLZ1. Выделенные из отобранных гибридизацией *in situ* с 5'-³²P-меченым 18-звенным олигонуклеотидом d(GCTATGACCATGATTAC), входящим в состав синтетического дуплекса, колоний плазмидные ДНК подвергали рестриктному анализу, включающему обработку эндонуклеазами EcoRI, EcoRV, XhoI. Отбирались плазмидные ДНК pPV1, которые при гидролизе EcoRV давали два фрагмента длиной приблизительно в 2000 и 5500 п. о. и имели уникальные XhoI- и EcoRI-сайты.

3'-Концевую часть гена β -галактозидазы, содержащую 58 п. о., получали лигированием восьма олигонуклеотидов. Синтетический фрагмент вводили в плазмиду pPV1, содержащую ген lacZ без 3'-концевой части, расщепленную нуклеазами EcoRI и HindIII. После клонирования в *E. coli* HB101 была выделена рекомбинантная плазмида pPV2, содержащая полную последовательность модифицированного гена β -галактозидазы, который выпеляется при совместном гидролизе плазмидной ДНК нуклеазами XhoI и HindIII (рис. 1). Первичная структура 5'- и 3'-концевых последовательностей гена, так же как и всех описанных ниже клонированных синтетических фрагментов ДНК, подтверждалась прямым секвенированием.

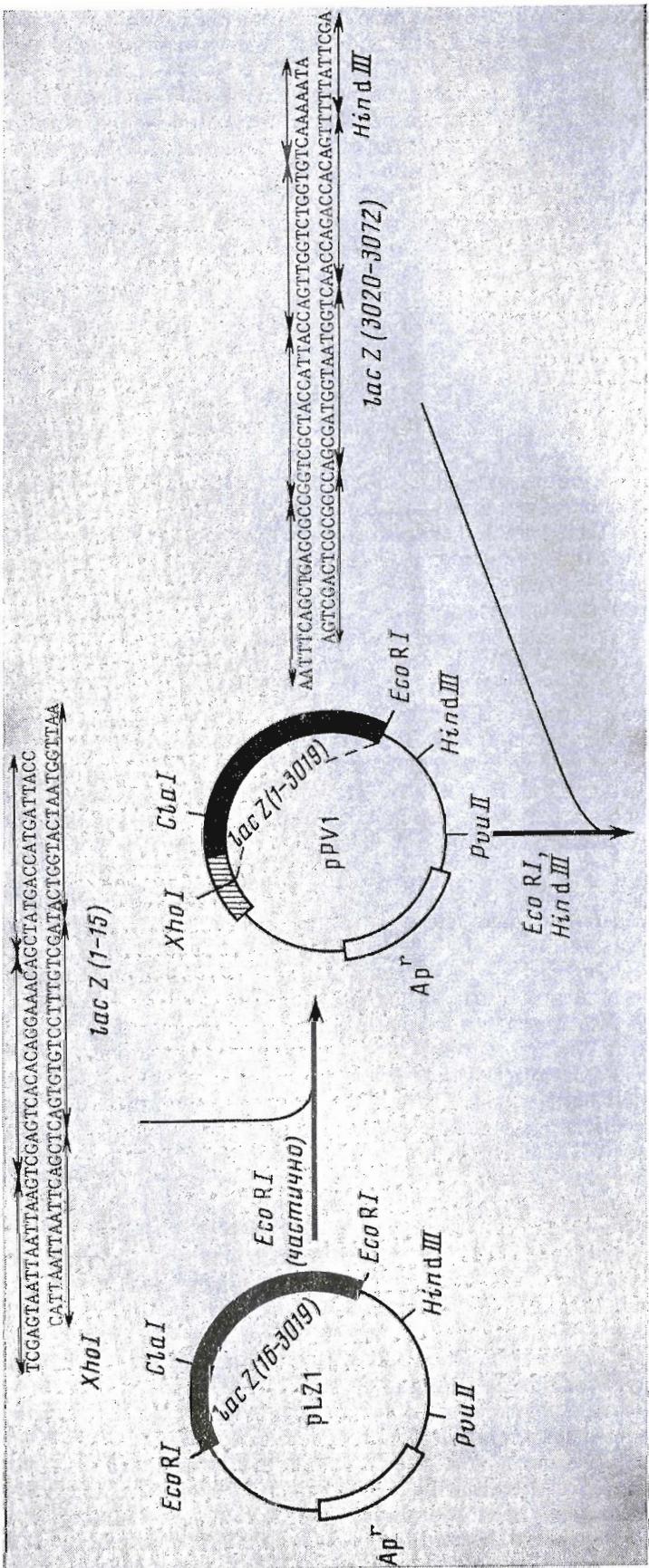
Полученный таким образом модифицированный полусинтетический ген β -галактозидазы по сравнению с геном lacZ дикого типа содержал следующие мутации:

1) G¹⁵ → C и C³⁰²⁴ → T; введены для уничтожения рестриктных сайтов EcoRI без изменения смысла кодовой матрицы;

2) G¹⁶ → A; приводит к аминокислотной замене Asp⁵ → Asn. Кроме того, в 5'-концевой участок этого фрагмента ДНК перед последовательностью SD был введен терминирующий кодон TAA в трех рамках считывания. Как показали дальнейшие эксперименты, все эти замены не повлияли на активность фермента β -галактозидазы.

В качестве последовательностей, соответствующих терминаторным участкам, в конструкцию промоторпробного вектора были введены терминатор гена кристаллического белка *Bacillus thuringiensis* (TCPG) [9] и терминатор из области ранних генов D10–D15 бактериофага T5 (tT5) [10]. Выбор этих последовательностей был связан с тем, что они являлись одними из наиболее сильных терминаторов, известных к моменту начала нашей работы. Так, терминатор TCPG содержит «шильку» из 17 п. о., 8 из которых G·C-пары, а терминатор фага T5 — «шильку» из 13 п. о., 7 из которых G·C-пары. Кроме того, их терминаторная функция не зависит от ориентации относительно гена.

Последовательность синтетического фрагмента ДНК, соответствующая терминатору гена кристаллического белка *B. thuringiensis* (TCPG), содержала 108 п. о. и имела на концах половинные сайты эндонуклеаз рестрикций HindIII и PvuII. Она была составлена из шести олигонуклеотидов и после их ферментативного сшивания с помощью Т4-ДНК-лигазы клонирована в *E. coli* HB101 в составе плазмиды pH52 [3], расщепленной эндонуклеазами HindIII и PvuII. Отбор трансформантов проводился гибри-



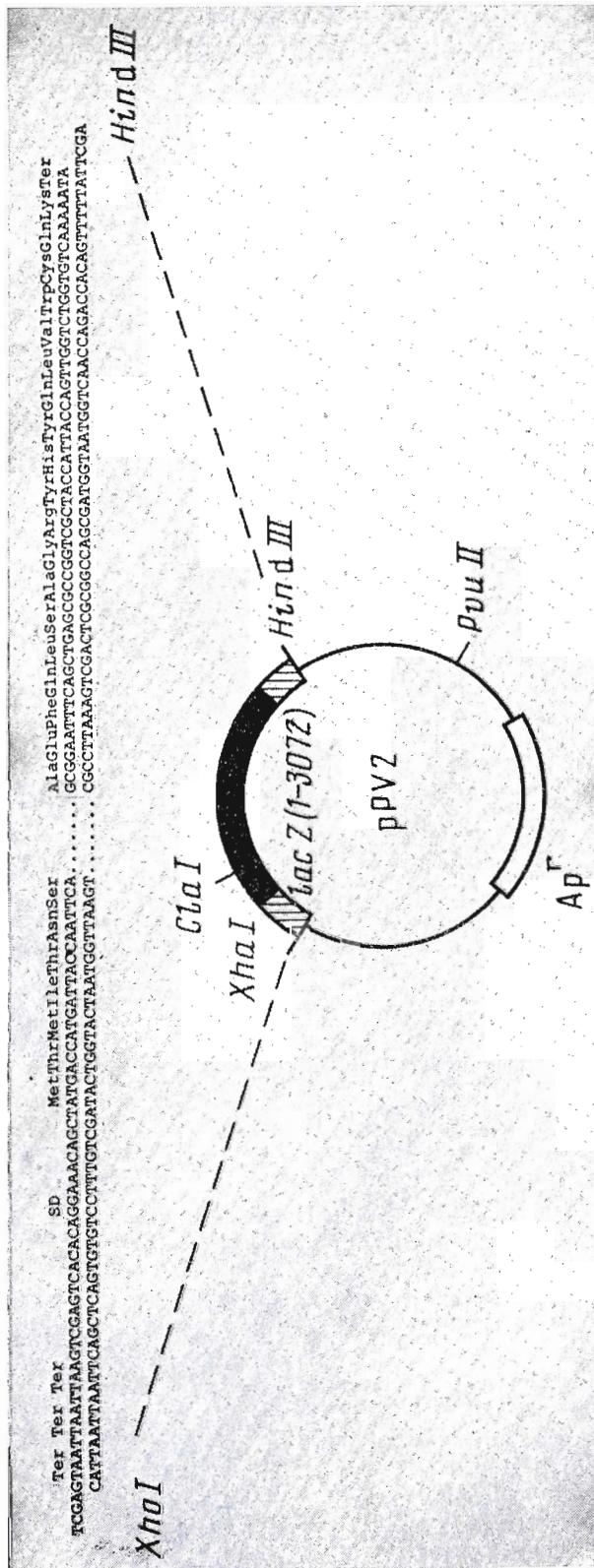
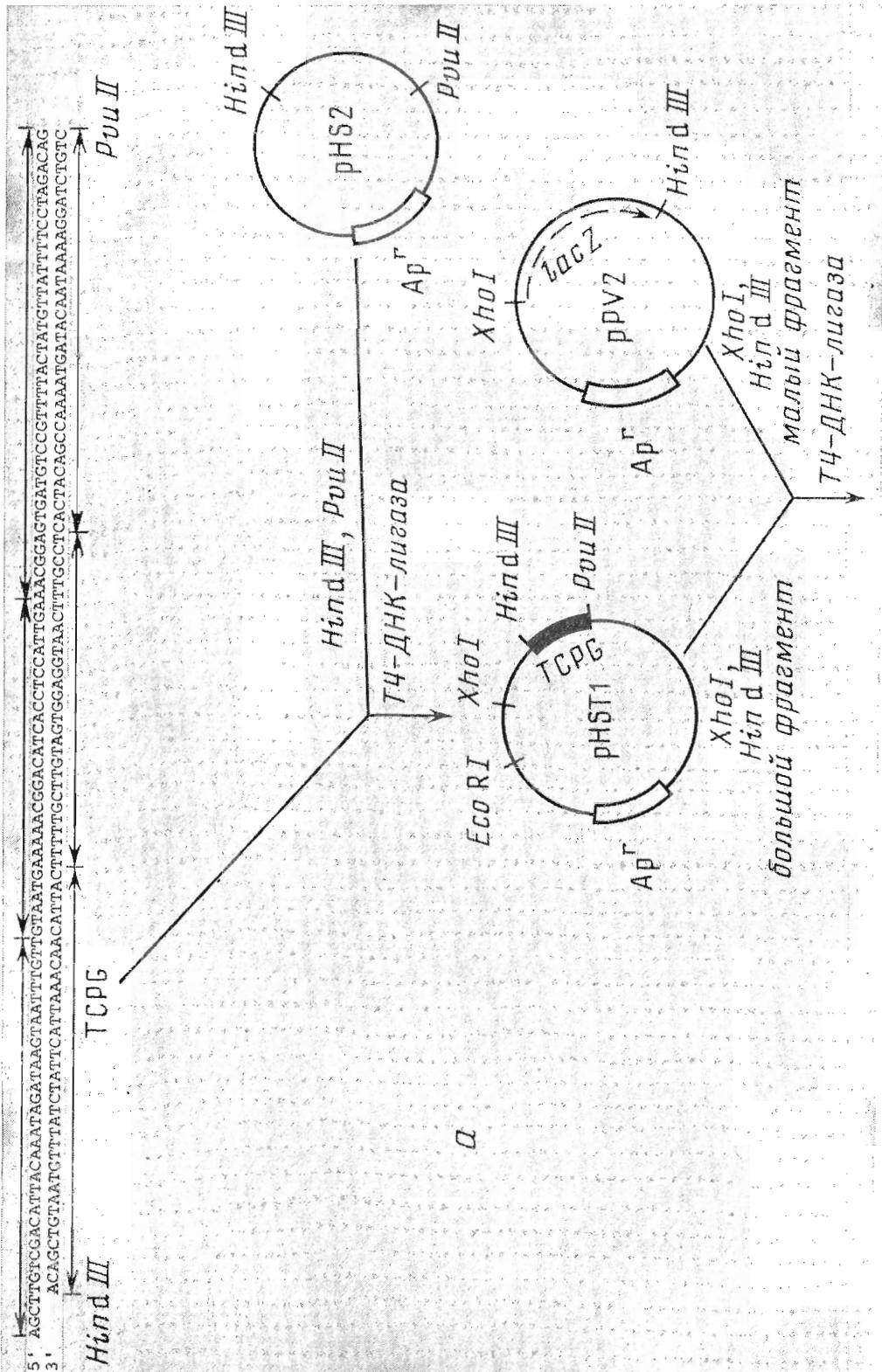
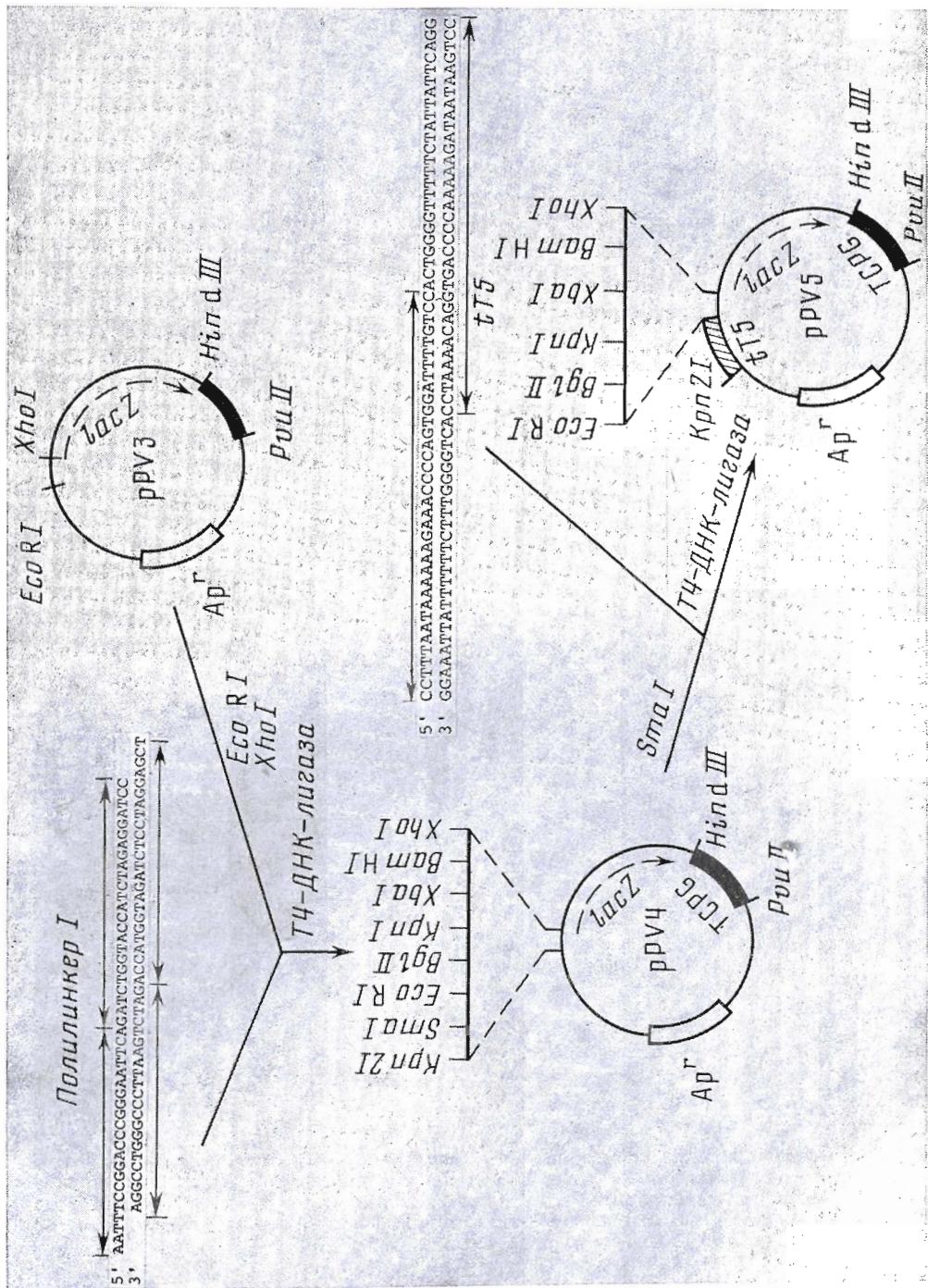


Рис. 4. Схема конструирования модифицированного гена β -галактозидазы *E. coli*. Показаны последовательности нуклеотидов синтетических 5'- и 3'-концевых участков гена. Стрелками показаны отдельные олигонуклеотиды, из которых собирались синтетические фрагменты. Зачерненные сегменты соответствуют природной последовательности гена *lacZ*, запримороженные — синтетическим фрагментам ДНК





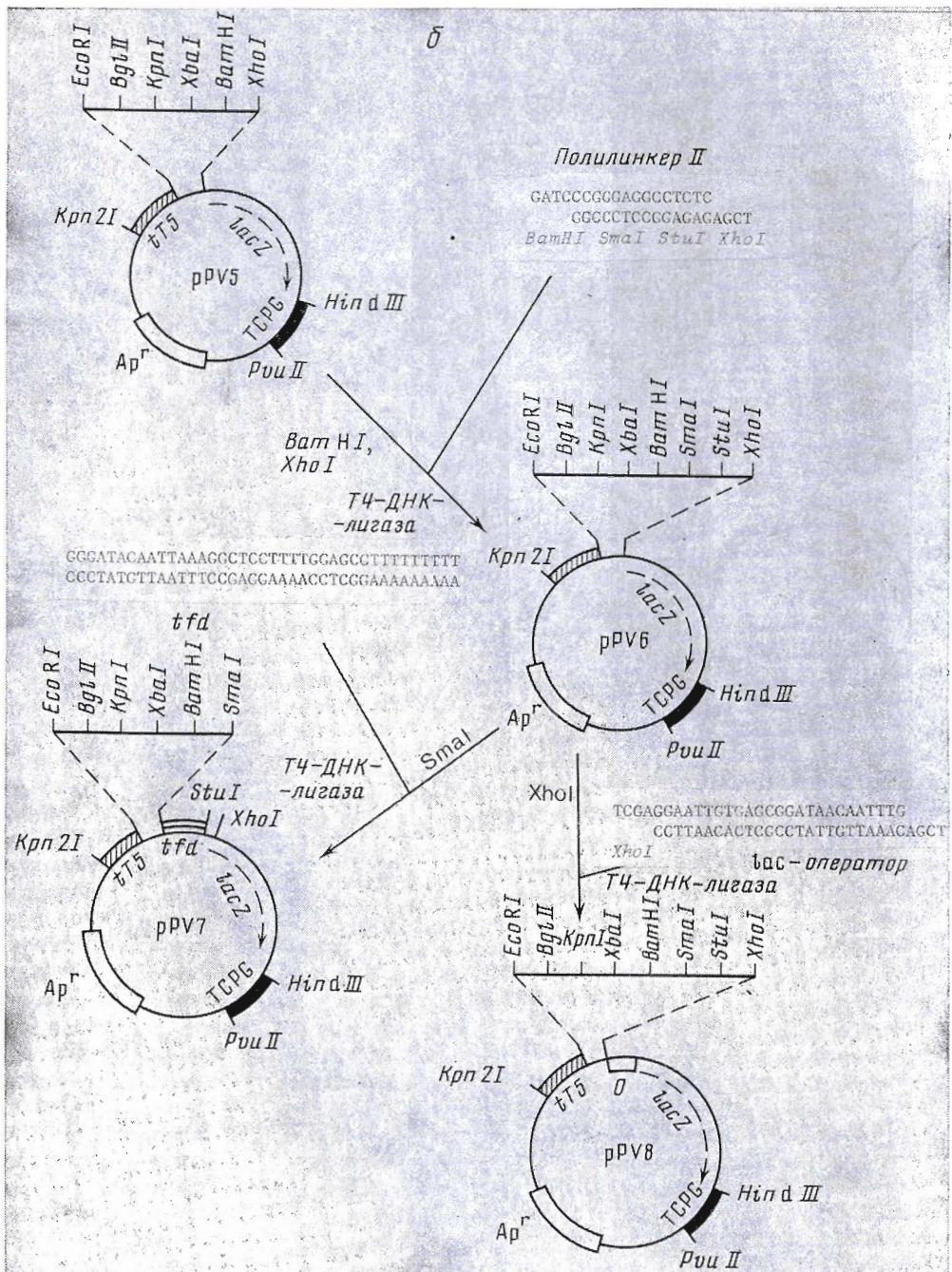


Рис. 2. Конструирование промоторпробных векторов. а — получение плазмид pPV4 и pPV5; б — получение плазмиды pPV8. Стрелками показаны отдельные олигонуклеотиды, из которых собирались синтетические полилинкеры и последовательности, соответствующие терминаторным участкам генов белков TCPG *B. thuringiensis*, tT5 фага T5 и tfd фага fd

Уровень экспрессии гена β -галактозидазы под контролем синтетических промоторов в промоторпробной плазмиде pPV5

Плазмида	Промотор	Активность β -галактозидазы *, тыс. ед.	Плазмида	Промотор	Активность β -галактозидазы *, тыс. ед.
pPVPL	P _L	17,60	pPVPII	P11	17,40
pPVM1	M1	6,20	pPVPII	P17	16,40
pPVM2	M2	6,90	pPVPII	P23	16,00
pPVM3	M3	3,90	pPVfd	fd	16,30
pPVM4	M4	0,05	pPV4	—	0,50
pPVP8	P8	17,60	pPV5	—	0,05
pPVP9	P9	10,50			

* Даны усредненные значения активности из трех независимых определений (см. «Экспериментальную часть»).

дизацией колоний *in situ* с 5'-³²P-меченным олигомером d(GTAATGAAAAA-CGGACATCACCTCCATTGA).

Далее полусинтетический ген β -галактозидазы с рибосомсвязывающим участком, расположенный на *Xba*I-*Hind*III-фрагменте длиной около 3100 п. о., был переклонирован в плазмиду pHST1 (рис. 2а), содержащую терминатор TCGT, с образованием вектора pPV3. Введение в этот вектор полилинкерной последовательности, образованной двумя 24-звенными и двумя 22-звенными олигонуклеотидами, между *Eco*RI- и *Xba*I-сайтами привело к получению вектора pPV4, уникальные сайты *Eco*RI, *Bgl*II, *Kpn*I, *Xba*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Kpn*I, *Sma*I которого были предусмотрены для введения в конструкцию исследуемых на промоторную активность фрагментов ДНК, а также второго терминаторного участка перед геномаркером. Последнее было сделано для устранения фонового биосинтеза β -галактозидазы, имеющего место на плазмиде pPV4, хотя она и не имела промотора непосредственно перед геномаркером (таблица), что, в частности, выражалось в голубой окраске несущих эту плазмиду колоний на агаризованной среде, содержащей X-Gal. Это особенно важно при идентификации в промоторпробной системе слабых промоторов.

Синтетический фрагмент ДНК, соответствующий последовательности терминатора транскрипции фага T5 (рис. 2а), получали репаративной достройкой частичного дуплекса, образованного 3'-концами 35- и 36-звенных олигонуклеотидов, в полностью двухцепочечный фрагмент ДНК с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) и четырех дезокси-нуклеозидтрифосфатов. Полученный дуплекс длиной в 60 п. о. клонировали по *Sma*I-сайту вектора pPV4. Ориентацию вставки и первичную структуру терминатора фага T5 подтверждали секвенированием фрагмента *Xba*I-*Kpn*I. Отобранный плазмиду pPV5 имела обратную ориентацию терминатора фага T5, что в соответствии с данными работы [10] не сказывалось на его функции.

Помимо вышеописанных плазмид были также получены варианты промоторпробной системы, содержащие дополнительно третий терминаторный участок (вектор pPV7) или операторный участок (вектор pPV8) в районе, расположенному между полилинкером и началом гена *lacZ*. Эти варианты предназначались для клонирования и тестирования сильных промоторов. С целью получения этих векторов между *Bam*HI- и *Xba*I-сайтами плазмиды pPV5 вводился синтетический фрагмент ДНК длиной 18 п. о., имеющий сайты эндонуклеаз рестрикции *Sma*I и *Stu*I, в результате чего была получена плазмиды pPV6. Затем этот вектор расщепляли нуклеазой *Sma*I и вводили в него синтетический полинуклеотид длиной 39 п. о., последовательность которого соответствовала последовательности терминатора фага fd [11] (вектор pPV7) (рис. 2б). Этот терминатор содержит «шильку» из 9 п. о., 5 из которых являются G-C-парами. Введение терминатора средней силы, каким является терминатор фага fd, должно было способствовать устойчивости всей системы при клонировании в нее очень сильных промоторов. С той же целью, а также для получения возможности осу-

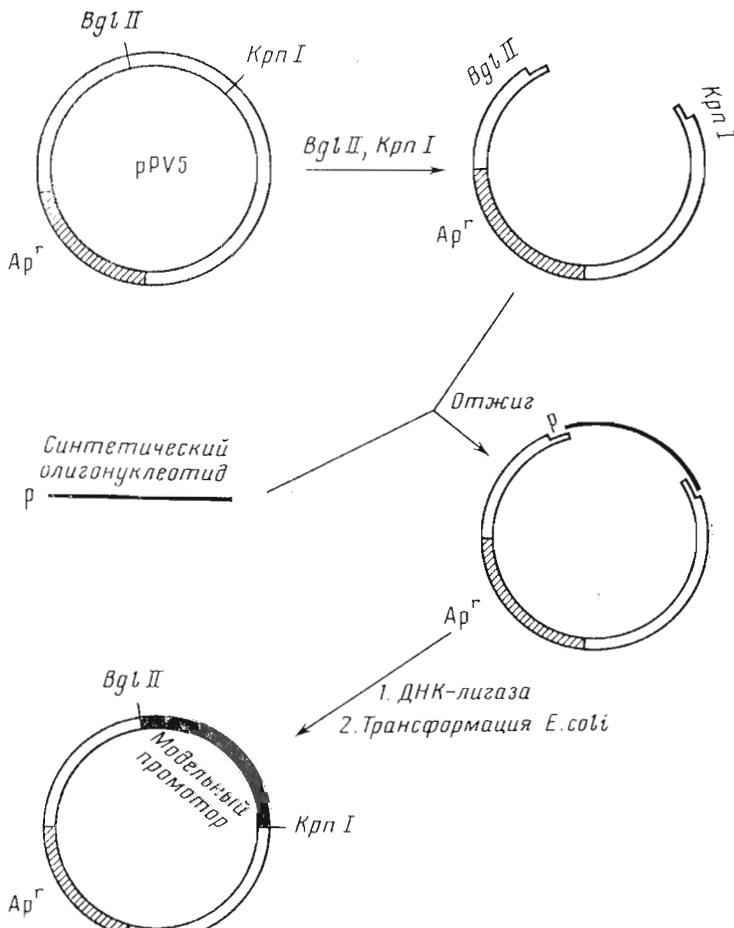
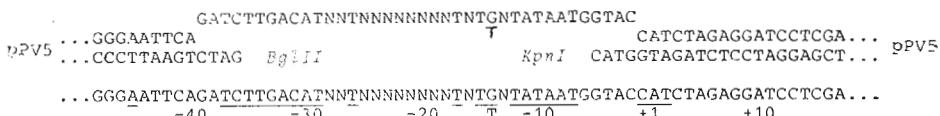


Рис. 3. Схема клонирования одноцепочечных олигонуклеотидов при получении модельных промоторов. P — 5'-фосфатная группа

ществления регулируемого синтеза β -галактозидазы в плазмиде pPV6 вводился по Xba I-сайту синтетический lac-оператор [12], представляющий собой состоящий из двух олигонуклеотидов дуплекс длиной 29 п. о. Ориентация синтетической вставки в полученной при этом плазмиде pPV8, как и в случае плазмиды pPV7, определялась с помощью рестриктного анализа и прямого секвенирования фрагментов ДНК.

Следует отметить, что структура полилинкеров плазмид pPV4 и pPV5 была составлена с учетом возможности конструирования промоторов непосредственно в этих векторах путем введения между Bgl II- и Kpn I-сайтами синтетических фрагментов ДНК, играющих роль участка промоторной области между (-1) - и (-40) -нуклеотидами. При этом фрагменты полилинкера левее и правее этих рестриктных сайтов играют роль соответственно (-40) - (-50) -района и участка инициации транскрипции, структура которых учитывает известные канонические последовательности для этих областей промоторов [13].

С использованием плазмид pPV4 — pPV8 нами были проведены эксперименты по получению ряда модельных промоторов и определению их активности с целью изучения влияния структуры промоторов в интервале между (-10) - и (-35) -областями на эффективность экспрессии гена-маркера. В данных модельных синтетических промоторах для бокса Прибнова и (-35) -участка были взяты канонические последовательности, а участок ДНК между ними имел наиболее распространенную длину в 17 н.п. [13] и максимально выраженную последовательность оснований. Для этого синтезировали смесь 38-звенных олигонуклеотидов состава



P8	AGATCTTGACATTTTTTTTTTTTATAATGGTACCA
P9	AGATCTTGACATTTTTTTT-TTTTTTTATAATGGTACCA
P11	AGATCTTGACATGTTATATTCTTGGTATAATGGTACCA
P17	AGATCTTGACATTTAACGTGTTGTGTTATAATGGTACCA
P23	AGATCTTGACATTATTCCGAGTGTGTTGATATAATGGTACCA

Рис. 4. Последовательности вырожденного и наиболее активных модельных синтетических промоторов, полученных введением смешанного 38-звенного олигонуклеотида в вектор pPV5. Чертежками показаны места делений нуклеотидных остатков. Подчеркнуты основания, совпадающие с канонической последовательностью

d(GATCTTGACATNNNTNNNNNNNTGNTATAATGGTAC), где N = A, G, С или Т. Химический синтез этих олигонуклеотидов проводили на полимерном носителе в одном эксперименте наращивания нуклеотидной цепи с использованием одновременного введения в определенных позициях последовательности смесей нуклеотидных компонентов реакции. Модельные синтетические промоторы конструировали непосредственно в промоторибной плазмиде введением между *BglII*- и *KpnI*-сайтами этой смеси 38-звенных олигонуклеотидов с использованием методологии клонирования одноцепочечных фрагментов ДНК, предложенной ранее [14, 15] (рис. 3). Аналогично клонировали олигонуклеотиды d(GATCTTGACATTTTTTTTTTTTTTATAATGGTAC) и d(GATCTTGACATTTTTTTTTTTTTTATAATGGTAC). В результате были получены промоторы, содержащие в интервале между (-10)- и (-35)- районами гомо-Т-последовательности длиной 17 и 16 н.о. Структуры некоторых из полученных таким образом модельных промоторов приведены на рис. 4.

Плазмидную ДНК pPV5 последовательность обрабатывали нуклеазой *BglII*, бактериальной щелочной фосфатазой, а затем лигировали с 5'-fosфорилированным олигонуклеотидом, используя последний в 1000-кратном избытке. Далее разводили реакционную смесь вдвое рестрикционным буфером и проводили обработку *KpnI*. После окончания реакции и инактивации фермента реакционная смесь подвергалась сильному разведению, что способствовало снижению межмолекулярного лигирования плазмидных ДНК. После проведения второй лигазной спlicing и трансформации клеток *E. coli* HB 101, среди клонов, выросших на агаризованной LB-среде, содержащей ампициллин и X-Gal, отбирали имеющие голубую окраску. Гибридизация *in situ* на нитроцеллюлозных фильтрах с ³²P-меченным исходным олигонуклеотидом и рестриктный анализ подтвердили наличие в отобранных клонах плазмид типа pPVP с клонированными в них модельными промоторами, последовательность которых определялась прямым секвенированием малого фрагмента *EcoRI-Xhol*.

Плазмиду pPV5 использовали также в качестве тест-системы для оценки силы ряда других синтетических промоторов, в частности промотора P_L ДНК бактериофага λ [16] и его мутантных форм.

Конструирование синтетического P_L промотора проводилось следующим образом. Сначала получали субфрагмент *EcoRI-HindIII*, состоящий из шести олигонуклеотидов длиной от 13 до 20 звеньев каждый. Последние спlicingали с помощью Т4-ДНК-лигазы и синтетический дуплекс встраивали в плазмиду pBRS3, гидролизованную нуклеазами *EcoRI* и *HindIII*. Эта плазмода была получена удалением из вектора pBR322 малого фрагмента *PvuII-SalI* с целью деления гена «гор», что должно приводить к ослаблению контроля репликации, повышению устойчивости плазмиды

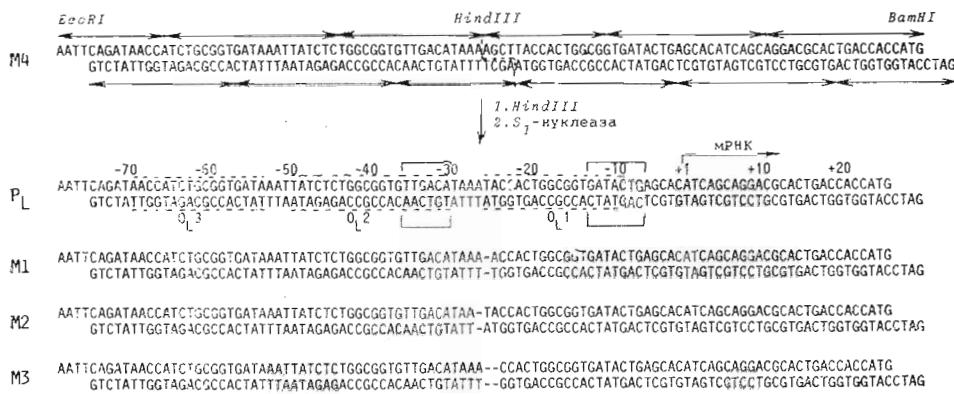


Рис. 5. Последовательность синтетической промоторной области P_L бактериофага λ и мутантов фага на ней. Чертежами показаны места делеций нуклеотидных остатков. Штриховыми линиями показаны операторные участки (O_L), а районы (-10)- и (-35)-нуклеотидов — сплошной линией. Стрелками отмечены отдельные олигонуклеотиды, из которых собирался промотор

с встроенными в нее сильными промоторами и увеличению ее копийности в 2–3 раза [17]. С этой целью ДНК плазмиды pBR322 обрабатывали нуклеазами *Pvu*II и *Sall*, а затем ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) в присутствии дезоксинуклеозидтрифосфатов. После лигирования полученного при этом большого фрагмента и селекции трансформантов *E. coli* была получена плазмиды pBR3.

Субфрагмент *Hind*III-*Bam*HI промотора получали лигированием четырех 20-звенных и двух 15-звенных олигонуклеотидов. Полученный при этом дуплекс клонировали в плазмидной ДНК, содержащей *Eco*RI-*Hind*III-субфрагмент промотора P_L , между *Hind*III- и *Bam*HI-сайтами. С помощью селекции полученных при трансформации колоний *E. coli* гибридизацией с ³²P-меченным 15-звенным олигонуклеотидом d(GATCCATGGTGGTCA), а также прямым секвенированием фрагмента *Eco*RI-*Bam*HI (98 п. о.) были выделены клоны с плазмидой pBRP1, содержащей полную последовательность промотора P_L , разделенную временным сайтом *Hind*III на два модуля (рис. 5).

Нативную форму P_L -промотора получали последовательной обработкой ДНК плазмиды pBRP1 эндонуклеазой рестрикции *Hind*III и S₁-нуклеазой. Полученный при этом большой фрагмент выделяли электрофорезом в 1% агарозном геле и затем лигировали. Рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* N99cI+. Полученные клоны анализировали на наличие сайта *Hind*III и определяли длину фрагмента, образующегося при гидролизе плазмидной ДНК нуклеазами *Eco*RI и *Bam*HI. Отбирали ДНК, имеющие вставку ожидаемого размера и не содержащие *Hind*III-сайта. По данным секвенирования, наряду с промоторами, имеющими целевую последовательность, были обнаружены мутанты с делециями в области *Hind*III-сайта (плазмиды pBRPM1, pBRPM2, pBRPM3, pBRPM4), отличающиеся от синтетического промотора P_L длиной спайсера между консервативными (-10)- и (-35)-областями.

Для тестирования активности промотора P_L и его мутантных форм фрагмент *Eco*RI-*Bam*HI плазмид pBRPL, pBRPM1, pBRPM2, pBRPM3, pBRPM4, соответствующий промоторной области, вводили в промотор-пробную плазмиду pPV5 по соответствующим сайтам и получали экспрессирующие плазмиды pPVPL, pPVM1, pPVM2, pPVM3, и pPVM4. Наряду с описываемыми в этой работе синтетическими промоторами в промотор-пробном векторе pPV5 по *Eco*RI-сайту был также клонирован полученный нами ранее промотор гена X ДНК фага fd [18] (плазмиды pPVfd).

Активности всех синтетических промоторов оценивались по способности обеспечивать экспрессию гена β-галактозидазы по стандартной методике [6] в штамме *E. coli* CSH36, дефектном по синтезу этого фермента, с учетом копийности вектора. Как показало измерение уровня экспрессии

гена *lacZ* под контролем P_L-промотора и модельных промоторов (рис. 4), изменение расстояния между (−10)- и (−35)-областями приводит к уменьшению активности промотора вплоть до полной его инактивации в случае M4 (таблица). Так, уменьшение длины спайсера с 17 до 16 н.о. приводит к заметному уменьшению силы промотора, делеция 2 н.о. уменьшает силу промотора в 5 раз, а введение дополнительных 4 п.о.— к полной потере активности. Из полученных нами данных следовало, что вышеупомянутые промоторные последовательности в ряду эффективности можно расположить следующим образом:

$$P_L \geq P8 \geq P11 > P17 > fd > P23 > P9 \geq M2 > M1 > M3 \geq M4$$

Таким образом, модельные промоторы P8, P11, P17, P23, а также промотор фага fd и P_L-промотор способны обеспечить высокоеэффективную прямую экспрессию селективного гена-маркера и могут быть использованы для создания векторов с высоким уровнем экспрессии различных генов. Клонирование олигонуклеотидов вырожденной структуры в промоторпробной системе открывает перспективу детального изучения структурно-функциональной организации промоторов и выяснения влияния конкретных структурных особенностей промоторного участка на уровень его активности. Следует отметить, что полученные нами векторы pPV4 и pPV5 помимо тестирования активности промоторов пригодны также для тестирования терминаторных и операторных последовательностей.

Авторы глубоко признательны В. Г. Коробко за предоставление плазиды pLZ1, а также Е. В. Дмитраковой и Чыонг Нам Хаю за помощь при тестировании активности промоторов и синтез некоторых олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции фирм Boehringer (ФРГ) и Pharmacia (Швеция), T4-ДНК-лигаза, T4-нелипополикулеотидкиназа и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы P-L Biochemicals (США), бактериальная щелочная фосфатаза (Amersham, Англия).

Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли фосфориэфириным методом с применением О-нуклеофильных катализаторов [19], а также фосфоамидитным методом [20] на синтезаторе «Gene Assembler» (Pharmacia). Синтетические олигонуклеотиды после удаления защитных групп очищали иррекартическим гель-электрофорезом и обращенно-фазовой хроматографией на приборе «FPLC» System (Pharmacia), а их структуры подтверждали методом Максама — Гилберта [21]. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью T4-нелипополикулеотидкиназы и [γ -³²P]АТР (3000 Кн/ммоль, Amersham, Англия) [21].

Ферментативные реакции. Репаративный синтез проводили в буфере, содержащем 50 мМ три-НCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ дитиогрейт, или в рестрикционном буфере (см. ниже). Во всех случаях использовали 100 мКМ растворы dNTP и 2–4 ед. акт. ДНК-полимеразы I *E. coli* на 100 мкл реакционной смеси. Реакцию проводили в течение 30 мин при 20° С и останавливали фенольной экстракцией белка и осаждением ДНК спиртом.

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции осуществляли в буфере, содержащем 20 мМ три-НCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl и 2 мМ дитиогрейт, в течение 1 ч при 37° С с использованием 0,5–1 ед. акт. фермента на 1–2 мкг ДНК. Для обработки ДНК бактериальной щелочной фосфатазой (ВАР) реакционную смесь разводили вдвое буфером, содержащем 0,05 М три-НCl (pH 8,0), 0,05 М NaCl, прибавляли 1 ед. акт. ВАР и инкубировали 1 ч при 65° С.

Реакции лигирования проводили 6–12 ч при 10° С с 250–500 пмоль олигомеров в реакционной смеси (100 мкл), содержащей 50 мМ три-НCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 100 мМ АТР и 20 единиц T4-ДНК-лигазы.

Обработку ДНК (10 мкг) S₁-нуклеазой (1 ед.) проводили при 20° С в течение 10–15 мин в растворе, содержащем 50 мМ ацетат натрия, 200 мМ NaCl и ZnCl₂.

Конструирование рекомбинантных плазид и трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также скрининг колоний гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами осуществляли согласно работе [22]. Плазидные ДНК выделяли как описано в работе [23].

Пуклеотидные последовательности клонированных ДНК определяли по методу Максама — Гилберта с использованием фрагментов, меченных по 3'-концу с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) [21].

Клонирование одноцепочных олигонуклеотидов. Избыток фосфорилированного олигонуклеотида (500 пмоль) лигировали с BglII-расцепленным и дефосфорилированным вектором (примерно 1 мкг) в течение ночи при 16° С в объеме 20 мкл, используя 5 ед. акт. T4-ДНК-лигазы. Смесь прогревали 10 мин при 65° С, разводили рестрикт-

ным буфером до 40 мкл, прибавляли эндонуклеазу *Kpn*I и инкубировали 1 ч при 37° С. Для инактивации *Kpn*I реакционную смесь прогревали 10 мин при 65° С, разводили до 200 мкл лизазным буфером, прибавляли 10 ед. акт. Т4-ДНК-полимеразы и проводили лигирование в течение 4 ч при 16° С. Полученные рекомбинантные молекулы использовали для трансформации клеток *E. coli* HB101.

Для определения активности β -галактозидазы [6] 0,5 мл ночной культуры клеток *E. coli* CSH33 (F^-), трансформированных промоторпробными плазмидами, несущими тестируемые промоторы, добавляли в 10 мл свежей среды M9, содержащей 0,2% глюкозу, 20 мкг/мл пролина, 50 мкг/мл ампциллина, 2 мкг/мл витамина В1, 0,1 мМ $MgSO_4$, и выращивали до поздней логарифмической фазы роста ($OE_{600} = 0,7 - 0,9$). Клетки охлаждали в ледяной бане в течение 20 мин, а затем 5–50 мкл супензии клеток размешали в смеси, содержащей 0,75 мл Z-буфера (0,06 М Na_2HPO_4 , 0,04 М Na_2HPO_4 , 0,1 М KCl, 0,001 М $MgCl_2$, 0,05 М β -меркаптоэтанол), 10 мкл хлороформа, 10 мкл 0,1% SDS и встряхивали 10–15 с. После инкубирования (5 мин при 28° С) добавляли в каждую пробу 0,2 мл α -нитрофенил- β -D-галактопирапозида (4 мг/мл) и встряхивали 5 с. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1 М Na_2CO_3 (рН 11,0) и пробирки центрифугировали 5 мин при 12 000 об/мин. Активность β -галактозидазы вычисляли в условных единицах, как описано в [6].

Для определения копийности плазмид определяли активность β -лактамазы микроподметрическим титрованием. Для этого к 0,1 мл супензии клеток, выращенных до поздней логарифмической фазы (как при определении β -галактозидазной активности) и означенных в течение 30 с при 10 кГц, прибавляли 1 мл раствора, приготовленного смешиванием 0,15 мл раствора иода, содержащего 2 г I_2 , 53,29 г KI на 100 мл H_2O , со 100 мл 0,2% раствора гидролизованного крахмала, 1 мл 0,2 мМ раствора пенициллина в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0) и 0,9 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0). Реакцию проводили при 25° С в течение 15–20 мин, затем измеряли оптическую плотность при 627 нм и рассчитывали активность β -лактамазы, как описано в работе [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. P. 20–31.
2. Messing J., Vieira J. // Gene. 1982. V. 19. № 3. P. 259–268.
3. Ефимов В. А., Мирских О. В., Чахмакчева О. Г., Овчинников Ю. А. // Биорган. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 621–627.
4. Чахмакчева О. Г., Бурякова А. А., Мирских О. В., Ревердатто С. В., Ефимов В. А., Овчинников Ю. А. // Биорган. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 1533–1546.
5. Чахмакчева О. Г., Мирских О. В., Чонг Нам Хай, Ефимов В. А. // Биорган. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 350–358.
6. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. С. 324–327.
7. Kuchinke W., Müller-Hill B. // EMBO J. 1985. V. 4. № 4. P. 1067–1073.
8. Коробко В. Г., Добринин В. Н., Нгуен Куанг Винь, Подладчикова О. Н., Северцовна И. В., Выстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чуприло С. А., Колосов М. Н. // Биорган. химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1285–1289.
9. Wong H. C., Chang S. // Sequence Specificity in Transcription and Translation. / Eds. Calendar R., Gold L. N. Y.: Alan R. Liss, Inc., 1985. P. 565–583.
10. Калиман А. В., Крутинина А. И., Крюков В. М. // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1987. № 10. С. 14–19.
11. Schaller H., Back E., Takanami M. // The single-stranded DNA phages. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978. P. 139–163.
12. Bolivar F., Betlach M. C., Heyneker H. L., Shine J., Rodriguez R. L., Bayler H. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 9. P. 5265–6269.
13. Hawley D. K., McClure W. R. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 8. P. 2237–2255.
14. Chakhmakhcheva O. G., Buryakova A. A., Efimov V. A. // Nucl. Acids Res. 1987. № 18. P. 217–220.
15. Derbyshire K. M., Salvo J. J., Grindley N. D. F. // Gene. 1986. V. 46. № 1. P. 145–152.
16. Drahos D., Szybalski W. // Gene. 1981. V. 16. № 2. P. 261–274.
17. Stueber D., Bujard H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 11. P. 1399–1404.
18. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмакчева О. Г. // Биорган. химия. 1979. Т. 5. № 12. С. 1782–1792.
19. Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Y., Polushin N. N., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6525–6540.
20. MacBrude J. J., Kierzek A., Beausage S. L., Caruthers M. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 108. № 8. P. 2040–2048.
21. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
22. Ефимов В. А., Чахмакчева О. Г. // Биорган. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 2084–2093.
23. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982. P. 90–91, 368–369.
24. Ross G. W., O'Callaghan C. H. // Meth. Enzymol. 1975. V. 43. P. 69–85.

Поступила в редакцию
27.VI.1988

CONSTRUCTION OF PROMOTER-PROBE VECTORS ON THE BASIS
OF A MODIFIED β -GALACTOSIDASE GENE OF *ESCHERICHIA COLI*

EFIMOV V. A., MIRSKIKH O. V., BURYAKOVA A. A., PASHKOVA I. N.,
POLUSHIN N. N., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

Plasmid-based promoter-probe vectors pPV4 and pPV5 have been constructed which are useful for comparing the relative efficiencies of bacterial promoters. The vectors utilize the β -galactosidase (*lacZ*) gene of *E. coli* as an indicator gene. The latter was modified using synthetic DNA fragments. The promoter-probe system contains the ampicillin resistance gene and the origin of replication of plasmid pBR322. The plasmids pPV4 and pPV5 carry clustered unique restriction sites usable for promoter insertions, and SD sequence. A synthetic DNA fragment corresponding to transcription terminator was inserted downstream the *lacZ* gene. Presence of the terminator made it possible to clone strong promoters controlling transcription of the *lacZ* gene. To prevent any undesired promoter effect, the plasmid pPV5 has also second synthetic terminator upstream from the polylinker sequence. Using this promoter-probe system, relative efficiencies of a series of synthetic promoters, including P_L promoter of phage λ and its mutant, gene X promoter of phage fd and several model statistic promoters, have been compared