



УДК 547.963.32.02:577.155.2.08

РЕСТРИКТАЗНАЯ КАРТА ОПЕРОНА *groBC* *E. coli*Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А.,
Некрасова О. В.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Данилевская О. Н., Федосеева В. В.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Изучено расположение сайтов действия рестриктаз во фрагменте *Hind* III-B ДНК* трансдуцирующего фага λ rif^d47, охватывающем область оперона *groBC* (за исключением концевой участка размером ~2 кнп). Рестриктаза *Eco* RI расщепляет фрагмент *Hind* III-B на 6 фрагментов, имеющих следующие размеры (в кнп) и порядок расположения с левого конца: D(4, 5)–H₁(2, 3)–J(1, 2)–F₁(2, 8)–K(1, 1)–*Eco* RI-I₁/*Hind* III-B (0,3). Фрагменты *Eco* RI-H₁, *Eco* RI-J, *Eco* RI-F₁ и *Eco* RI-K получены в индивидуальном состоянии путем клонирования в плазидах рМВ9 и рSF 2124; изучено расщепление этих *Eco* RI-фрагментов и фрагмента *Hind* III-B рестриктазами *Hpa* I и *Hae* III. Во фрагменте *Eco* RI-K, содержащем начало гена *gro* В, определено расположение сайтов действия рестриктаз *Hpa* II и *Hind* II.

Гены β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы, *gro* В и *gro* С, транскрибируются в основном с промотора P₃, расположенного в хромосоме *E. coli* перед еще 2 генами рибосомных белков, *rpl* J и *rpl* L [1, 2]. Межцистронная область непосредственно перед геном *gro* В обладает выраженной регуляторной функцией и содержит аттенюатор и, возможно, независимый слабый промотор [1–3]. Гены *gro* В и *gro* С образуют, таким образом, оперон *groBC*. В предыдущей работе [4] мы изучили его расположение в ДНК трансдуцирующих фагов λ att80rif^d35 и λ rif^d47 и выделили из ДНК последнего фрагмент *Hind* III-B, охватывающий область оперона *groBC*, за исключением концевой участка размером 0,8–1,8 кнп**. На левом конце этого фрагмента имеется участок длиной ~4 кнп, занятый собственной ДНК фага λ , а на правом – ген рибосомного белка L7/L12, *rpl* L. Рестриктаза *Eco* RI расщепляет фрагмент *Hind* III-B на 6 фрагментов: *Eco* RI-D (4,5 кнп), содержащий ДНК λ , *Eco* RI-H₁ (2,3 кнп), *Eco* RI-J (1,2 кнп), *Eco* RI-F₁ (2,8 кнп), *Eco* RI-K (1,1 кнп) и *Eco* RI-I₁/*Hind* III-B (0,3 кнп), представляющий собой часть фрагмента *Eco* RI-I₁ до сайта рестриктазы *Hind* III. Наибольший интерес для нас представляло определение первичной структуры нетранслируемых регуляторных участков генов *gro* В и *gro* С, которые должны находиться в *Eco* RI-фрагментах К и J. В связи с этим мы изучили рестриктазные карты района ДНК, охватывающего весь

* Поскольку статья посвящена структуре ДНК, префикс d для краткости всюду опущен.

** кнп – число пар нуклеотидов в тысячах.

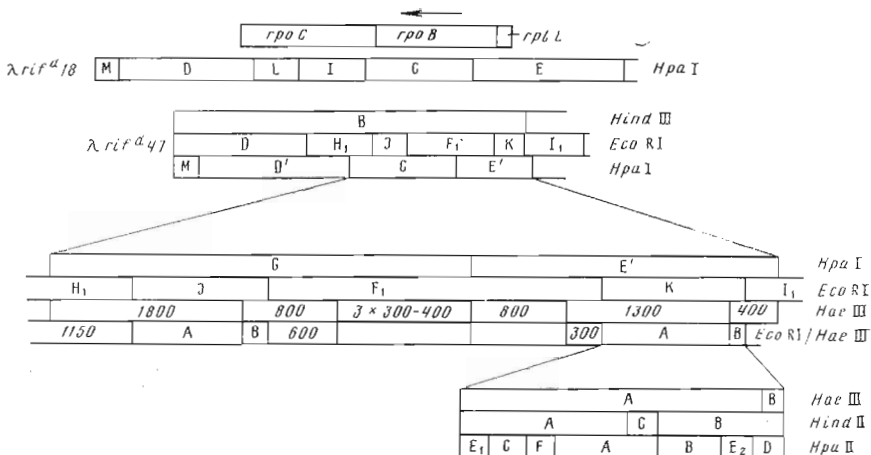


Схема расщепления фрагмента *Hind*III-B ДНК λ *rif^{d47}* рестриктазами *Eco*RI, *Hpa*I, *Hae*III, *Hind*II и *Hpa*II. Приведена *Hpa*I-рестриктазная карта аналогичного участка ДНК λ *rif^{d18}* по данным работы [5]. Фрагменты, образующиеся при действии каждой рестриктазы, в соответствии с их величиной обозначены буквами в алфавитном порядке, или дан их размер в нп. Указано также расположение генов *rplL*, *rpoB* и *rpoC* и направление транскрипции

оперон *rpoBC*, но более детально — расположение сайтов действия рестриктаз в *Eco*RI-фрагментах К и J.

Чтобы определить, как ориентированы фрагменты *Eco*RI-K и *Eco*RI-J в ДНК целого оперона, мы решили выделить и подвергнуть дальнейшему расщеплению участка фрагмента *Hind*III-B, в которых к *Eco*RI-фрагментам К и J справа и слева были бы присоединены части соседних фрагментов. Для этой цели мы использовали рестриктазу *Hpa*I, которая, как было показано в случае λ *rif^{d18}* [5], имеет по одному сайту действия во фрагментах *Eco*RI-H₁ и *Eco*RI-F₁ и не затрагивает фрагменты *Eco*RI-I₁, *Eco*RI-J и *Eco*RI-K.

При расщеплении фрагмента *Hind*III-B ДНК λ *rif^{d47}* рестриктазой *Hpa*I образовались 4 фрагмента (рисунок), из которых фрагменты М (~0,8 кнп) и G (~3,7 кнп), очевидно, идентичны соответствующим *Hpa*I-фрагментам М и G ДНК λ *rif^{d18}*, фрагмент E' (~2,5 кнп) представляет собой часть *Hpa*I-фрагмента E, а фрагмент D' (~5,2 кнп) образовался взамен фрагментов *Hpa*I-D, *Hpa*I-L и *Hpa*I-I ДНК λ *rif^{d18}*.

Следующим шагом было изучение действия других рестриктаз на фрагменты *Hpa*I-G и *Hpa*I-E' и на входящие в их состав *Eco*RI-фрагменты К, J, H₁ и F₁ ДНК λ *rif^{d47}*. Для этого необходимо было располагать индивидуальными *Eco*RI-фрагментами. С целью их препаративного получения мы использовали химерные плазмиды, сконструированные на основе плазмиды pSF2124, несущей признак устойчивости к пенициллину (интегрированные *Eco*RI-фрагменты К либо H₁), или плазмиды pMB9, несущей признак устойчивости к тетрациклину (интегрированные *Eco*RI-фрагменты J либо F₁). Для синтеза таких химерных плазмид мы применили предварительное расщепление ДНК λ *rif^{d47}* рестриктазой *Sma*I, которая должна расщеплять все *Eco*RI-фрагменты, кроме расположенных в области оперона *rpoBC*, как это было показано в предыдущей статье [4]. Поэтому при последующем действии рестриктазы *Eco*RI лишь *Eco*RI-фрагменты К, J, H₁ и F₁ обладали двумя одинаковыми «липкими» концами и допускали образование кольцевых молекул с расщепленной *Eco*RI векторной ДНК. Сшивку «липких» концов и синтез таким образом химерных плазмид мы проводили при помощи T4-лигазы и затем использовали их для трансформации по методу [6] клеток реципиентного штамма *E. coli* C600rk^{-mk}⁻.

после чего отбирали клоны, устойчивые к тетрациклину или пенициллину.

Плазмидную ДНК после отделения от хромосомной ДНК *E. coli* расщепляли рестриктазой *EcoRI* и фрагменты разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные таким образом индивидуальные *EcoRI*-фрагменты К, J, H₁ и F₁ использовались для дальнейшего расщепления другими рестриктазами. Образующиеся при этом субфрагменты разделяли электрофорезом в 5% полиакриламидном геле. Их величину определяли на основании логарифмической зависимости между числом нуклеотидных пар (*N*) и электрофоретической подвижностью (*E*, мм) по формуле

$$\frac{E - E_1}{E_2 - E_1} = \frac{\lg N_1 - \lg N}{\lg N_1 - \lg N_2},$$

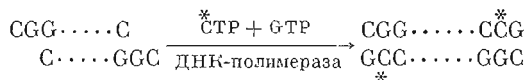
за исходные величины принимали подвижности *EcoRI*-фрагмента К (*E*₁, *N*₁=1100 нп) и стандартного маркерного красителя ксиленцианола FF, подвижность которого в использованных условиях гель-электрофореза (*E*₂) соответствовала подвижности двунитчатой ДНК длиной *N*₂=260 нп [7].

Рестриктаза *HaeIII* производила в *EcoRI*-фрагментах J и K лишь по одному разрыву, так что в обоих случаях большие субфрагменты имели величину ~1000 нп, а малые — ~70 нп (фрагмент *EcoRI*-K/*HaeIII*-B) и ~240 нп (фрагмент *EcoRI*-J/*HaeIII*-B). Размеры концевых *HaeIII*-субфрагментов, полученных из фрагмента *EcoRI*-F₁, составили 300 и 600 нп, а из фрагмента *EcoRI*-H₁ были получены два одинаковых концевых фрагмента — по 1150 нп (см. табл. 2, «Экспериментальная часть»).

Учитывая эти данные, мы обработали фрагменты *HpaI*-G и *HpaI*-E' (см. рисунок) рестриктазой *HaeIII*. В результате из фрагмента *HpaI*-E' образовались субфрагменты размером 1300, 800 и 400 нп, а из фрагмента *HpaI*-G — субфрагменты размером 1800, 800, 400 и 300 нп (см. табл. 1 и «Экспериментальная часть»).

Расположение сайтов рестриктазы *HaeIII* показано на рисунке. Отсюда следует, что малые субфрагменты *EcoRI*-K/*HaeIII*-B и *EcoRI*-J/*HaeIII*-B находятся в правых частях *EcoRI*-фрагментов, т. е. ближе к началу транскрипции.

Расщепление фрагмента *EcoRI*-K на более мелкие и составление его детальной физической карты мы провели с помощью рестриктаз *HpaII*, гидролизующей последовательность нуклеотидов C³CGG, и *HindII*, в сайте действия которой, GTY¹RAC, не образуется выступающих однонитчатых участков. Для обнаружения *HpaII*-субфрагментов мы проводили достройку однонитчатых участков с помощью ДНК-полимеразы I в присутствии [α-³²P]СТР и избытка ГТР:



Чтобы сохранить метку в ранее достроенных концевых участках $\overset{\text{A}}{\text{A}}\overset{\text{T}}{\text{T}}$, в реакционную смесь вводили также избыток дТТР. Тупые концы *HindII*-субфрагментов при таком способе введения практически не содержали радиоактивной метки.

Для составления рестриктазной карты наряду с полным гидролизом указанными рестриктазами мы использовали результаты ограниченного гидролиза (0,1 ед. акт. фермента на 1 пмоль ДНК, 3—10 мин при 37° С) (см. табл. 3 и рисунок), а также последовательный гидролиз двумя рестриктазами. Данные по гидролизу *HindII*-субфрагментов рестриктазой *HpaII* приведены в табл. 4; при действии рестриктазы *HaeIII* гидролизу подвергался лишь один из концевых *HpaII*-субфрагментов, D. Полученные результаты суммированы на рисунке.

Выше уже было отмечено, что вблизи правого конца фрагмента *Hind*III-В ДНК λ ri^d47 расположен ген рибосомного белка L7(L12), *rplL*. Часть структурного гена этого белка, кодирующая С-концевой участок, должна находиться в правой части фрагмента *Eco*RI-К. Из аминокислотной последовательности белка L7(L12) [8] следует, что в его структурном гене имеется единственный возможный сайт узнавания рестриктазой *Eco*RI, G¹AATTC (аминокислотные остатки ...Glu-Phe...), расположенный на расстоянии 198–204 нп от С-концевого звена структурного гена. Таким образом, структурный ген белка L7(L12) должен располагаться в субфрагментах *Eco*RI-К/*Hpa*II-D и *Eco*RI-К/*Hpa*II-Е₂. Мы проверили это, определив последовательность нуклеотидов в субфрагменте *Eco*RI-К/*Hpa*II-D. Оказалось, что она полностью соответствует ожидаемой для 40 аминокислотных остатков белка L7(L12) [14]. Отсюда следовало, что регуляторный участок гена *groB* должен находиться в субфрагменте *Eco*RI-К/*Hpa*II-В. Мы определили нуклеотидную последовательность этого фрагмента и обнаружили в нем участок, функционирующий, по-видимому, как аттенуатор [15]. Начало структурного гена *groB* оказалось в субфрагменте *Eco*RI-К/*Hpa*II-А, на расстоянии 560 нп от конца фрагмента *Eco*RI-К [16]. Поскольку размер структурного гена *groB* составляет 4,2 кнп, его конец и начало структурного гена *groC* должны располагаться в пределах субфрагмента *Eco*RI-Ж/*Hae*III-А. С учетом размера структурного гена *groC* (4,5 кнп) конец оперона *groBC* должен при этом находиться на расстоянии 1,5–2,0 кнп слева от фрагмента *Eco*RI-Н₁.

Экспериментальная часть

ДНК плазмиды рМВ9 получена от Н. А. Чурикова (ИМБ АН СССР), плазмиды рSF2124 — от М. Я. Рабиновича (ВНИИгенетика).

Ферменты: использовали лизоцим (КФ 3.2.1.17) фирмы PL Biochemicals (США); Т4 ДНК-лигаза выделена по методу [9]; рестрикционные эндонуклеазы (КФ 3.1.4.32) *Eco*RI, *Sma*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Hind*III и *Hae*III, а также ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7) выделены как описано в предыдущей статье [4].

Буферные растворы: А — 90 мМ трис-борат, 2,5 мМ EDTA, pH 8,3; В — 300 мМ трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, pH 9,0; Г — 1 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, pH 6,8; Д — 0,4 мМ гАТФ, 10 мМ MgCl₂; Е — 50 мМ трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, 70 мМ гАТФ, 10 мМ дитиотреит, pH 7,5; Ж — 10 мМ трис-НСl, 50 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, pH 8,0; З — 0,1 мМ Na₂CO₃, 10 мМ EDTA; И — 0,9 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, pH 7,4; II — 0,5 мМ NH₄OAc, 10 мМ Mg(OAc)₂, 0,1 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфат Na; К — 50 мМ TEAB, pH 8,0; Л — 10 мМ трис-НСl, 1 мМ EDTA, pH 7,6; М — 0,01 мМ К-фосфат, pH 6,7; Н — 0,1 мМ К-фосфат, pH 6,7; О — 0,4 мМ К-фосфат, pH 6,7; П — 0,1 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ β-меркаптоэтанол, pH 7,6; Р — 0,1 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5 мМ NaCl, pH 7,5; С — 0,2 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ β-меркаптоэтанол, pH 7,5.

Реактивы и сорбенты: триптон, дрожжевой экстракт, агар (Difco, США), [α-³²P]NTP (120–250 Ки/ммоль, Amersham, Англия); NTP, гАТФ и дитиотреит (Calbiochem, США). Суммарную тРНК (Boehringer, ФРГ) очищали как описано в предыдущей статье [4]; силиконовый пеногаситель С (Serva, ФРГ), додецилсульфат Na (Sigma, США), оксианатит (биогель НТР) и биогель А (Bio-Rad, США), трис, персульфат аммония, акриламид и N,N'-метиленабисакриламид (Reanal, Венгрия) перед употреблением перекристаллизовывали. Для приготовления питательных сред использовали также «Аминопептид» производства завода медицинских препаратов Ленинградского мясокомбината.

Малые количества ДНК осаждали из растворов в присутствии тРНК-носителя, как описано в предыдущей статье [4]. Электрофорез в 1,2 и 1% агарозном геле или в 5% полиакриламидном геле (соотношение акрил-

амид — N,N'-метиленбисакриламид 29 : 1) проводили в пластинах (400××200×1 мм) в буфере А. Перед нанесением на гель к образцу прибавляли 10% по объему 50% раствора сахарозы в 10 мМ EDTA, содержащего по 0,02% маркерных красителей — бромфенолового синего и ксиленицианола FF. Прокрашенные бромистым этидием гели просматривали и фотографировали (панхроматическая фотопленка 250 ед. ГОСТ, светофильтр ОС-14) в камере Birchover Instruments (Англия) при освещении лампами с излучением 254 и 366 нм. Радиоавтографы получали на рентгеновской пленке Kodak XR-5.

Получение химерных плазмид, содержащих участки оперона groBC. К раствору 5 мкг (0,17 пмоль) ДНК λrif^{d47} в 10 мкл буфера В прибавляли 2 мкл раствора рестриктазы *Sma*I (0,01 ед. акт.), инкубировали 2 ч при 30° С и затем нагревали 15 мин при 70° С. Прибавляли 1 мкл буфера В и 2 мкл раствора рестриктазы *Eco*RI (0,02 ед. акт.), инкубировали 1 ч при 37° С и смешивали с 6 мкл раствора 0,1 мкг плазмидной ДНК (0,01 пмоль рSF2124 или 0,02 пмоль рMB9), предварительно гидролизованной *Eco*RI в тех же условиях. Смесь нагревали 15 мин при 70° С, прибавляли 4 мкл буфера Г и 1 мкл раствора Т4 ДНК-лигазы (10 ед. акт.), выдерживали 1,5 ч при 8–10° С, затем прибавляли 0,5 мл буфера Д и еще 1 мкл раствора Т4 ДНК-лигазы и выдерживали 18–20 ч при 8–10° С. Полученный раствор, содержащий ДНК смеси химерных плазмид, использовали для трансформации клеток реципиента.

К 1 мл культуры реципиента *E. coli* С600rk⁻mk⁻, полученной и обработанной 0,05 М СаСl₂ по методу [6], прибавляли 0,25 мл раствора ДНК смеси химерных плазмид, выдерживали 1 ч при 0° С, нагревали 2,5 мин при 42° С, прибавляли 4 мл питательной среды, содержащей 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 1% NaCl, и выращивали 3 ч при 37° С и интенсивной аэрации. Полученную культуру высевали на чашки с той же питательной средой, содержащей 1,2% агара и 20 мкг/мл тетрациклина (предназначены для исходной плазмиды рMB9) или 200 мкг/мл калиевой соли бензилпенициллина (предназначены для исходной плазмиды рSF2124). Отдельные колонии рассевали и проверяли в «грубых» лизатах (см. [10]) наличие в клетках плазмид с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. В случае вектора рSF2124 предварительно отбирали клоны, утратившие способность к образованию колицила (см. [11]). Из клонов, содержащих плазмиды большего размера, чем исходные векторы, выделяли плазмидную ДНК с помощью ультрацентрифугирования в равновесном градиенте CsCl, содержащем бромистый этидий, по методу [12]. Затем ДНК обрабатывали рестриктазой *Eco*RI и полученные фрагменты подвергали электрофорезу в пластине агарозного геля рядом с эталонным набором *Eco*RI-фрагментов ДНК λrif^{d47} . Наконец, соответствие интегрированных в плазмиды фрагментов определенным участкам ДНК λrif^{d47} подтверждали с помощью гетеродуплексного анализа.

Для препаративного выделения ДНК *Eco*RI-фрагментов λrif^{d47} далее использовали плазмиды рOD117 (на основе рMB9, с интегрированным фрагментом *Eco*RI-J), рOD162 (на основе рMB9, с интегрированным фрагментом *Eco*RI-F₁), рOD303 (на основе рSF2124, с интегрированным фрагментом *Eco*RI-H₁) и рOD262 (на основе рMB9, с интегрированным фрагментом *Eco*RI-K).

Выделение ДНК химерных плазмид с интегрированными EcoRI-фрагментами K, J, H₁ и F₁ ДНК λrif^{d47}. 50 мл посевной культуры *E. coli*, содержащей химерную плазмиду рOD117, рOD162 или рOD262, выращенной в течение ночи при 37° С до D₅₅₀ 5–10, вносили в 5 л среды, содержащей 2,5 л «Аминопептида», 30 г Na₂HPO₄, 15 г KH₂PO₄, 25 г NaCl, 5 г NH₄Cl, 75 мг СаСl₂, 0,5 г MgSO₄, 10 г глюкозы, 0,1 мл пеногасителя и 100 мг хлоридрата тетрациклина (или 50 мл посевной культуры *E. coli*, содержащей химерную плазмиду рOD303, вносили в 5 л среды того же состава, но содержащей вместо тетрациклина 1 г калиевой соли бензилпенициллина),

и выращивали 2–3 ч при 37° С до D_{550} 0,7–0,8. Затем прибавляли раствор 850 мг хлорамфеникола в 12 мл спирта и выращивали еще 24 ч. Все стадии выращивания проводили при аэрации 10 л/мин (через пористый стеклянный фильтр № 2). Полученную суспензию охлаждали до 10° С, центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин (центрифуга Векман J-21В, ротор JA-10), клетки суспендировали в 100 мл буфера *E* и снова центрифугировали в тех же условиях. Далее все операции проводили при 0° С. Для разрушения клеток 6 г полученной биомассы суспендировали в 24 мл 25% раствора сахарозы в 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, прибавляли 5 мл того же раствора, содержащего 25 мг лизоцима, и выдерживали 30 мин. Затем прибавляли 5 мл 0,25 М EDTA, рН 8,0, через 5 мин — 5 мл 10% раствора додецилсульфата Na, еще через 12 мин — 14,5 мл 5 М NaCl и оставляли на ночь. Осадок отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 17 000 об/мин (центрифуга Векман J-21В, ротор JA-20). К супернатанту, содержащему плазмидную ДНК, прибавляли равный объем изопропанола, выдерживали 20 ч при 0° С и затем центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин, осадок высушивали в вакууме, растворяли в 10 мл буфера *Ж*, выдерживали 24 ч при 20° С. Нерастворившуюся часть осадка отделяли центрифугированием (10 мин при 4000 об/мин), к супернатанту прибавляли 1 мл даукса 50×8 (NH₄⁺-форма), через 15 мин катионит отделяли центрифугированием и к супернатанту прибавляли 1 мл 5 М NH₄OAc и 20 мл спирта, смесь замораживали при -70° С, оттаивали, осадок отделяли центрифугированием при 4000 об/мин, промывали спиртом и высушивали в вакууме. В полученном осадке неочищенной плазмидной ДНК содержится значительное количество фрагментированной рРНК и тРНК. Выход плазмидной ДНК составлял 3–5 мг.

Выделение EcoRI-фрагментов K, J, H₁ и F₁ из плазмидной ДНК. Неочищенную плазмидную ДНК, содержащую 1 мг химерной плазмиды (0,4 нмоль плазмиды рOD303 либо 0,25 нмоль плазмиды рOD117, рOD162 или рOD262), растворяли в 5 мл воды. К полученному раствору прибавляли 0,5 мл буфера *Z* и 300 мкл раствора рестриктазы *EcoRI* (3 ед. акт.), инкубировали 3–5 ч при 37° С, затем реакцию останавливали и смесь подвергали электрофоретическому разделению в условиях, описанных ранее [4]. Для извлечения *EcoRI*-фрагмента F₁, H₁, K или J вырезанные диски геля с зонами очищенного фрагмента (общий объем 3–4 мл) замораживали при -70° С, измельчали в замороженном состоянии, оттаивали и центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин. К остатку агарозы прибавляли 3–4 мл буфера *I*, инкубировали 3 ч при 45° С, охлаждали, агарозу отделяли центрифугированием и промывали 2–3 мл буфера *I*. Из объединенного фильтрата осаждали ДНК с тРНК-носителем, затем растворяли в 100 мкл буфера *K* и фракцию ДНК отделяли на колонке (0,7×15 см) с биогелем А 1,5м в буфере *K*, контролируя процесс с помощью микроспектрофотометра МСФП-1. Осадок агарозы после экстракции (объем 1 мл) растворяли при 37° С в 5 мл насыщенного раствора KI в буфере *L*, прибавляли 0,5 мл оксипатита, выдерживали 20 мин при 37° С, затем центрифугировали и осадок промывали 1,5 мл буфера *M* и затем 1,5 мл буфера *H*, после чего ДНК элюировали двумя промывками по 0,5 мл буфера *O*. Раствор упаривали в вакууме до 0,2–0,3 мл и фракцию ДНК отделяли на колонке (0,7×15 см) с биогелем А 1,5м в буфере *K*. Из объединенного раствора осаждали ДНК с тРНК-носителем. Выход *EcoRI*-фрагментов K или J составлял 30–60 мкг, а *EcoRI*-фрагментов H₁ или F₁ — 50–100 мкг.

Получение HpaI-фрагментов G и E'. 30 мкг (3 нмоль) *HindIII*-фрагмента В ДНК *λrif^d 47* [4] растворяли в 170 мкл воды, прибавляли 20 мкл буфера *P* и 10 мкл раствора рестриктазы *HpaI* (0,2 ед. акт.), инкубировали 2 ч при 37° С, наносили на пластину 1% агарозного геля рядом с эталонным набором *EcoRI*-фрагментов ДНК *λrif^d 47* и подвергали электрофорезу. По достижении бромфеноловым снним нижнего края пластины гель прокрашивали бромистым этидием, просматривали при освещении ультрафио-

Таблица 1

Размеры продуктов гидролиза *HpaI*-фрагментов G и E' рестриктазой *HaeIII*

Обозначение	<i>EcoRI</i> -фрагменты ДНК λ rif ^d 47 [13]		<i>HaeIII</i> -субфрагменты из G		<i>HaeIII</i> -субфрагменты из E'	
	E, мм	Величина, нп	E, мм	Величина, нп	E, мм	Величина, нп
F ₁	98	2800				
H ₂	104	2400				
H ₁	105	2300				
I	110	2050	117	1800		
J	126	1200			125	1300
K	130	1100				
			142	800	140	800
			172	400	175	400
			190	300		

Таблица 2

Размеры концевых *HaeIII*-субфрагментов, полученных из *EcoRI*-фрагментов K, J, H₁ и F₁

K		J		H ₁		F ₁	
E, мм	Величина, нп	E, мм	Величина, нп	E, мм	Величина, нп	E, мм	Величина, нп
40	1000	42	950	35	1150	62	600
		103	240			93	300
158	70						

летом и вырезали зоны, близкие по электрофоретической подвижности к *EcoRI*-фрагменту E (3600–3700 нп, *HpaI*-фрагмент G) и *EcoRI*-фрагменту H (2500 нп, *HpaI*-фрагмент E'). Извлечение ДНК из геля проводили как описано выше. Выход *HpaI*-фрагментов G и E' составлял 4 и 3 мкг.

Расщепление *HpaI*-фрагментов G и E' рестриктазой *HaeIII*. К раствору 3 мкг (1 пмоль) *HpaI*-фрагмента E' или 4 мкг (1 пмоль) *HpaI*-фрагмента G в 45 мкл воды прибавляли 6 мкл буфера II и 5 мкл раствора рестриктазы *HaeIII* (0,2 ед. акт.), инкубировали 1 ч при 37°С, наносили на пластину 1,2% агарозного геля рядом с эталонным набором *EcoRI*-фрагментов ДНК λ rif^d47 и подвергали электрофорезу. После прохождения бромфеноловым синим 2/3 длины пластины гель прокрашивали бромистым этидием и фотографияровали при освещении ультрафиолетом. Электрофоретические подвижности и величины обнаруженных *HpaI/HaeIII*-субфрагментов приведены в табл. 1.

Определение размеров концевых *HaeIII*-субфрагментов, образующихся из *EcoRI*-фрагментов K, J, H₁ и F₁. 0,2 мкг (0,1–0,2 пмоль) *EcoRI*-фрагмента K, J, H₁ или F₁, выделенных как описано выше и меченных по концам с помощью ДНК-полимеразы и [α^{32} -P]АТР по методу [13], растворяли в 20 мкл воды, прибавляли 2 мкл буфера II, 1 мкл (0,04 ед. акт.) раствора рестриктазы *HaeIII* и выдерживали 1 ч при 37°С. Затем осаждали ДНК с тРНК-носителем и наносили на пластину 5% полиакриламидного геля в буфере А. Электрофорез проводили при напряжении 200 В до прохождения бромфеноловым синим расстояния 20 см. Электрофоретические подвижности и величины обнаруженных радиоавтографически концевых *HaeIII*-субфрагментов приведены в табл. 2.

Определение размеров продуктов гидролиза *EcoRI*-фрагмента K рестриктазами *HpaII* и *HindII*. 1,1 мкг (1 пмоль) *EcoRI*-фрагмента K, вы-

Продукты гидролиза *EcoRI*-фрагмента К рестриктазами *HpaII* и *HindII*

<i>HpaII</i>			<i>HindII</i>		
Субфрагмент	Е, мм	Величина, нп	Субфрагмент	Е, мм	Величина, нп
А	87	350			
В	104	220			
С	131	130			
Д*	135	110	Р1**	160	600
Е*	142	100	А*	163	570
F	147	90	Р2**	170	500
Р1**	102	230	В*	176	450
Р2**	107	210			

* Концевые субфрагменты.

** Концевые субфрагменты при частичном гидролизе.

Продукты гидролиза *EcoRI*-К/*HindII*-фрагментов А и В рестриктазой *HpaII*

А			В		
Субфрагмент	Е, мм	Величина, нп	Субфрагмент	Е, мм	Величина, нп
А'	101	250			
			В	104	220
С	131	130	Д*	135	110
Е ₁ *	142	100	Е ₂	142	100
F	147	90			

* Концевые субфрагменты.

деленного как описано выше и меченного по концам с помощью ДНК-полимеразы и [α -³²P]АТР по методу [13], растворяли в 52 мкл воды, прибавляли 6 мкл буфера II и 2 мкл (0,1 ед. акт.) раствора рестриктазы *HpaII* или 6 мкл буфера P и 2 мкл (0,1 ед. акт.) раствора рестриктазы *HindII*. Реакционную смесь инкубировали при 37° С, отбирая по 15 мкл через 3 и 10 мин, реакцию останавливали, прибавляя 1 мкл 0,5 М EDTA.

Для введения радиоактивности в субфрагменты, не содержащие концевой метки, реакцию в оставшихся 15 мкл раствора через 4 ч останавливали, прогревая его 3 мин при 80° С; по охлаждении прибавляли 10 мкл буфера С, по 2 мкл 5 мМ растворов GTP и TTP и 40 мкл 4 мМ раствора [α -³²P]СТР и 1 мкл (1 ед. акт.) раствора ДНК-полимеразы Кленова. Полимеразную реакцию проводили в течение 15 мин при 20° С и останавливали прибавлением 10 мкл 0,5 М EDTA. Все пробы обессоливали фильтрацией через колонку (0,7×15 см) с биогелем А 1,5 м в буфере К, контролируя процесс с помощью микроспектрофотометра МСФП-1 и счетчика Гейгера типа Thias III. ДНК осаждали с тРНК-носителем.

Аналогично проводили гидролиз смесей *EcoRI*/*HaeIII*-субфрагментов, а также разделенных электрофоретически *HindII*-субфрагментов *EcoRI*-фрагмента К, получение которых описано выше.

Электрофорез проводили на пластине 5% полиакриламидного геля до прохождения ксиленцианолом FF расстояния 100 мм. Электрофоретические подвижности и величины обнаруженных радиоавтографически субфрагментов приведены в табл. 3 и 4.

Авторы выражают благодарность М. Я. Рабиновичу (ВНИИгенетика) и Н. А. Чурикову (ИМБ АН СССР) за предоставление ДНК плазмид-векторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Linn T., Scaife J. (1978) *Nature*, **276**, 33-37.
2. Post L. E., Strycharz G. D., Nomura M., Lewis H., Dennis P. P. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1697-1701.
3. Bass I. A., Gorlenko Zh. M., Danilevskaya O. N., Dmitriev A. D., Kalyaeva E. S., Mindlin S. Z., Timopheev A. V., Khesin R. B. (1977) *Mol. Gen. Genet.*, **154**, 101-110.
4. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Данилевская О. Н., Ковалев Ю. Н. (1980) *Биооргани. химия*, **6**, 1196-1204.
5. Boros I., Sain B. (1977) *Mol. Biol. Repts*, **3**, 451-457.
6. Chang A. C. Y., Cohen S. N. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1030-1034.
7. Maniatis T., Jeffrey A., van de Sande H. (1975) *Biochemistry*, **14**, 3787-3794.
8. Terhorst C., Möller W., Laursen R., Wittman-Liebold B. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 138-152.
9. Panet A., van de Sande J. H., Loeven P. C., Khorana H. G., Paae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5045-5050.
10. Bedbrook G. R., Ausubel F. A. (1976) *Cell*, **9**, 707-716.
11. So M., Gill R., Falkow S. (1975) *Mol. Gen. Genet.*, **142**, 239-245.
12. Bazaral M., Helinski D. R. (1968) *J. Mol. Biol.*, **36**, 185-194.
13. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Колосов М. Н. (1978) *Биооргани. химия*, **4**, 628-638.
14. Гуревич А. И., Аваков А. Э. (1979) *Биооргани. химия*, **5**, 301-304.
15. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Колосов М. Н. (1979) *Биооргани. химия*, **5**, 779-781.
16. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Колосов М. Н. (1979) *Биооргани. химия*, **5**, 1735-1739

Поступила в редакцию
26.XI.1979

RESTRICTION ENDONUCLEASE MAP OF THE *rpoBC* OPERON OF *E. coli*

GUREVICH A. I., AVAKOV A. E., KISELEVA O. A.,
NEKRASOVA O. V., DANILEVSKAYA O. N., FEDOSEEVA V. B.

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

The positions of several restriction endonuclease sites are determined in the transducing phage λ rif^{d47} DNA *Hind*III-B fragment which spans the *rpoBC* operon of *E. coli*, except the end part of approximately 2 kb long. The *Hind*III-B fragment was cleaved by restrictase *Eco*RI into 6 fragments of following size (kb number) and sequence from the left end: D(4,5)-H₁(2,3)-J(1,2)-F₁(2,8)-K(1,1)-*Eco*RI-I₁/*Hind*III-B(0,3). The pure fragments *Eco*RI-H₁, *Eco*RI-J, *Eco*RI-F₁ and *Eco*RI-K are obtained after cloning into the plasmids pMB9 and pSP2124. The cleavage of these fragments and of the *Hind*III-B fragment by restrictases *Hpa*I and *Hae*III is studied. The positions of restrictases *Hpa*II and *Hind*II sites are determined in the *Eco*RI-K fragment containing the proximal part of the *rpoB* gene.