



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.04

p/c 1

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОМОТОРОВ *rrn* В *Escherichia coli*Гуревич А. И., Аваков А. Э., Игошин А. В.,
Колосов М. И.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

В быстро растущих клетках *E. coli* около половины всех синтезируемых РНК приходится на долю рибосомных, хотя их гены (семь оперонов *rrn*) в сумме составляют меньше 0,5% генома бактерии. Поэтому считают (см. [1] и цитированные там работы), что сродство РНК-полимеразы к промоторам *rrn* по крайней мере на порядок превышает среднюю величину ее сродства к другим промоторам. В связи с этим мы осуществили выделение коротких рестриктных фрагментов из инициаторной области оперона *rrnB* с целью использовать их в качестве переносных промоторов для конструирования функционально-активных искусственных генов.

Исходным веществом в этой работе являлась ДНК трансдуцирующего фага $\lambda rif^{s}47$, у которого начало гена *rrnB* находится в *EcoRI*-фрагменте H_2 длиной около 2400 п.о. [2] (рис. 1). Для препаративного получения этого фрагмента *EcoRI*-гидролизат фаговой ДНК разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле, смесь близких по величине фрагментов H_1 и H_2 выделяли электрооэлюцией, лигировали с *EcoRI*-расщепленным вектором pBRN4 [3] и клонировали в *E. coli* HB101, отбирая трансформанты на среде, содержащей 20 мкг/мл тетрациклина. При рестриктном анализе плазмидной ДНК из Tc^r -колоний была обнаружена рекомбинантная плазида, которая содержит *EcoRI*-вставку ожидаемого размера и при гидролизе эндонуклеазой *HindIII* дает фрагмент величиной 570 п.о. Эта плазида, обозначенная pRRN1, послужила источником *EcoRI*-фрагмента H_2 для дальнейшей работы.

Ранее была определена нуклеотидная последовательность инициаторной области [4] и всего оперона *rrnB* [5]. Было установлено, что синтез РНК на этом и других оперонах *rrn* начинается с двух промоторов (P_1 и P_2), которым предшествует протяженный участок с повышенным содержанием А·Т-пар и несколькими потенциальными сайтами узнавания РНК-полимеразы, что, возможно, способствует быстрой инициации транскрипции [4]. Поэтому представляло интерес выделить из инициаторной области *rrnB* оба промотора и этот участок, чтобы исследовать их независимо.

Для выделения промотора P_2 мы гидролизовали фрагмент *EcoRI*- H_2 эндонуклеазой *ThaI* (при 60° С), а затем *BspRI*. Образовавшуюся смесь субфрагментов лигировали с самокомплементарным синтетическим тетрадекануклеотидом ATCCGAATTCGGAT, обрабатывали эндонуклеазой *EcoRI* и клонировали в *EcoRI*-сайте вектора pBR322mp15 [6]. Реципиентом служила *E. coli* HB101, селекцию трансформантов проводили на устойчивость к тетрациклину. Структура полученной рекомбинантной плазмиды pRRN2, содержащей фрагмент (I) оперона *rrnB*, приведена на рис. 2.

Аналогичным путем был выделен тандем промоторов P_1+P_2 (фрагмент (II) на рис. 1); единственное отличие состояло в том, что в этом случае была опущена стадия гидролиза эндонуклеазой *BspRI*. Клонирование проводили с тем же линкером и в том же векторе, полученная плазида обозначена pRRN3.

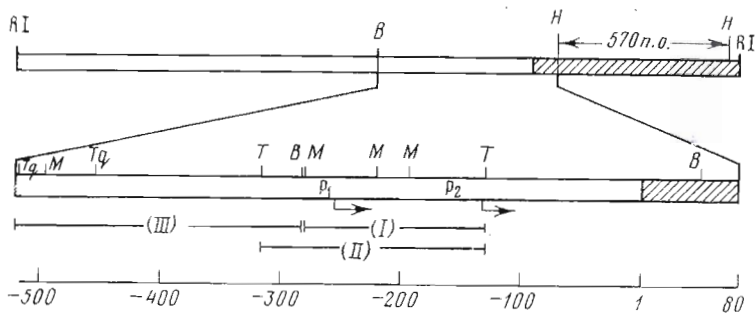


Рис. 1. Физическая карта *EcoRI*-фрагмента λ_2 ДНК λrif^{d47} . Нумерация нуклеотидов от точки, соответствующей 5'-концу зрелой 16S рРНК (заштрихована рДНК). Стрелками отмечены старты транскрипции оперона *rrnB* с промоторов P_1 и P_2 . Показано расположение сайтов эндонуклеаз *EcoRI* (RI), *HindIII* (H), *BspRI* (B), *MspI* (M), *ThaI* (T) и *TaqXI* (Tq). Римскими цифрами обозначены фрагменты ДНК, клонированные в настоящей работе

Предшествующий промоторам А·Т-богатый участок (III) был вырезан из *EcoRI*-фрагмента λ_2 эндонуклеазой *BspRI*, выделен электрофорезом в 5% полиакриламидном геле (ПАГ), сплит с линкером АТССГААТТССГАТ и гидролизирован нуклеазой *EcoRI*. Полученный *EcoRI*-фрагмент длиной 219 п.о. метили по 3'-концу [α - 32 P]dATP + [α - 32 P]TTP с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и расщепляли эндонуклеазой *MspI* на субфрагменты (длиной 34 и 189 п.о.), которые выделяли в чистом виде электрофорезом в 5% ПАГ. С другой стороны, тот же фрагмент *EcoRI*-219 клонировали в векторе pBR322, отбирая трансформанты с рекомбинантными плазмидами путем гибридизации колоний по методу [7] с радиоактивными фрагментами *EcoRI/Msp*-189 и *EcoRI/Msp*-34. В результате была выделена плаزمида pRRN4, в которой фрагмент (III) ориентирован по отношению к промотору P_{tet} вектора так же, как к промотору P_2 в опероне *rrnB*.

Нуклеотидная последовательность *rrn*-вставок (I) — (III) в плазмидах pRRN2 — pRRN4 была определена на 5'- и 3'-меченных *EcoRI*-фрагментах. Для разделения концевых меток эти фрагменты гидролизировали нуклеазой *BspRI* или *MspI* (или денатурировали нагреванием в 75% диметилсульфоксиде) и меченные субфрагменты (или комплементарные цепи) выделяли электрофорезом в 5% ПАГ; частичную химическую модификацию и электрофорез в 10 и 15% денатурирующем ПАГ проводили как описано [8]. Полярность вставок (I) и (II) в плазмидах pRRN2 и pRRN3 была доказана определением нуклеотидной последовательности *MspI*-фрагментов, расщепляющихся нуклеазой *EcoRI*. Для определения полярности вставки (III) плазмиду pRRN4 расщепляли нуклеазой *HindIII*, метили по 3'-концу по методу [9] и гидролизировали *MspI*; при этом наряду с фрагментом *HindIII/MspI*-132 (происходящим из участка 30—161 ДНК pBR322) образовался *HindIII/MspI*-фрагмент длиной 221 п.о.

Таким образом, нами получены рекомбинантные плазмиды pRRN2 — pRRN4, несущие однопромоторный (I), двухпромоторный (II) и предпромоторный (III) фрагменты инициаторной области оперона *rrnB*. Наидеящая в них суммарно нуклеотидная последовательность (III—I) полностью соответствует опубликованной ранее [4] с учетом более позднего уточнения [5], которое нами дополнительно подтверждено расщеплением фрагмента (III) в положении -448 эндонуклеазой *TaqXI* (сайт $CC\downarrow(A/T)GG$ [10]). Функциональную активность этих фрагментов, т. е. их влияние на экспрессию гена *tet* в рекомбинантной плазмиде, оценивали косвенно, по резистентности бактериальной клетки к тетрациклину, которую измеряли методом [11]. Во всех случаях величина EO_{50} плазмид серии pRRN оказалась значительно выше, чем у pBR322. Следует особо отметить, что по сравнению с исходным вектором рекомбинантная плазмиды pRRN4 вызывала у *E. coli* повышение устойчивости к тетрациклину

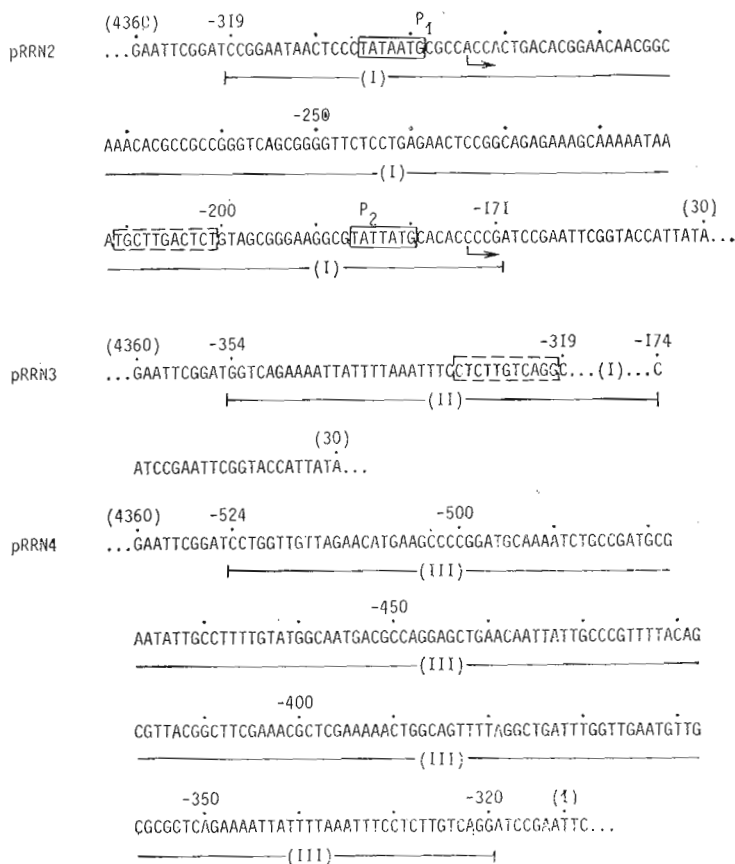


Рис. 2. Структура рекомбинантных плазмид, содержащих фрагменты (I) – (III) инициаторной области оперона *rnrB*. Приведена нуклеотидная последовательность верхней цепи ДНК. Концевые нуклеотиды этой последовательности (и не показанная на рисунке ДНК за их пределами) принадлежат рВR322; их нумерация дана в скобках и соответствует использованной Сатклиффом [12]. Обозначение фрагментов и отрицательная нумерация нуклеотидов те же, что на рис. 1. В сплошные рамки заключены Прибноу-боксы, в пунктирные — область -35 промоторов P₁ и P₂. Стрелками отмечены старты транскрипции

в 2 раза, откуда следует, что вставка фрагмента (III) непосредственно перед промотором P₁ вдвое увеличивает интенсивность транскрипции.

Авторы выражают благодарность И. А. Басс за плазмиду рВRН4, В. Г. Коробко за плазмиду рВR322mpt5 и В. Н. Добрынину за синтетический линкер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Young R. A., Steitz J. A. Cell, 1979, v. 17, № 1, p. 225–234.
2. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Данилевская О. Н., Ковалев Ю. Н. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1196–1204.
3. Rodríguez R. L., West R. W., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 10, p. 3267–3287.
4. Csordás-Góth E., Boros I., Venetianer P. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 8, p. 2189–2197.
5. Brosius J., Dull T. J., Sleeter D. D., Noller H. F. J. Mol. Biol., 1981, v. 148, № 2, p. 107–127.
6. Коробко В. Г., Добрынин В. П., Чувпило С. А., Северцова Л. А., Шингарова Л. Н., Колосов М. Н. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 309–312.
7. Grunstein M., Wallis J. In: Methods in Enzymology. Vol. 68. Recombinant DNA/ Ed. Wu R. N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 379–389.
8. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
9. Гуревич А. И., Аваков А. Э. Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 301–304.

10. Грачев С. А., Мамаев С. В., Гуревич А. И., Игошин А. В., Колосов М. Н., Слюсаренко А. Г. Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 628–630.
11. Tait R. C., Rodriguez R. L., Boyer H. W. Mol. Gen. Genet., 1977, v. 151, № 3, p. 327–331.
12. Sutcliffe J. G. C. S. H. Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77–90.

Поступило в редакцию
7.XII.1981

ISOLATION OF *rrnB* PROMOTERS OF *ESCHERICHIA COLI*

GUREVICH A. I., AVAKOV A. E., IGOSHIN A. V., KOLOSOV M. N.

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

A 2400 b.p. long *EcoRI* fragment of phage λ rif^d47 DNA (Fig. 1) carrying a proximal portion of *E. coli* ribosomal RNA operon *rrnB* was used to construct a series of recombinant plasmids pRRN (Fig. 2) which contain the promoter region of *rrnB* or fragments thereof. The first plasmid, pRRN1, was obtained on cloning the *EcoRI* fragment into the respective site of pBRH4 vector and was employed for preparation of this fragment for subsequent constructions. Hydrolysis of the *EcoRI* fragment with restriction enzymes *ThaI* and then *BspRI* or with *ThaI* alone followed by cloning into vector pBR322mpt5 with the synthetic *EcoRI* linker ATCCGAATTCGGAT resulted in recombinant plasmids pRRN2 and pRRN3, respectively. An A-T-rich sequence upstream from the *rrnB* promoters was cut off the *EcoRI* fragment with restriction enzyme *BspRI* and cloned with the same linker into the *EcoRI* site of pBR322 to yield the recombinant plasmid pRRN4. As compared with pBR322, the four pRRN plasmid were found by the EOP₅₀ method [11] to confer to *E. coli* a significantly higher resistance against tetracycline. With the last plasmid, the antibiotic resistance was twice as high as that of pBR322, the presence of the A-T-rich sequence immediately upstream from the promoter thus appearing to strongly influence the rate of the transcription.