

5. Diamond A., Dudock B. Structure and properties of a bovine liver UGA suppressor serine tRNA with a tryptophan anticodon // Cell. — 1981. — 25, N 2. — P. 497—506.
6. Тукило М. А., Васильченко И. Г., Власов В. В. Ультрамикроспектрофотометрические методы исследования первичной структуры тРНК // Методы молекуляр. биологии. — Киев: Наук. думка, 1979. — С. 111—126.
7. Rogg H., Müller P., Staechelin M. Nucleotide sequences of rat liver serine tRNA. Structure of serine tRNA<sub>3</sub> and partial nucleotide sequences of serine tRNA<sub>2a</sub> // Eur. J. Biochem. — 1975. — 53, N 1. — P. 115—127.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,  
Киев

Получено 20.02.87

УДК 577.212

### ХИМЕРНЫЙ ГЕН *rpoC'*-*LACZ'* РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ *pUC19*, СОХРАНЯЮЩЕЙ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Е. Б. Патон, А. Н. Живолуп

Для изучения функциональной топографии основного фермента транскрипции *E. coli* — ДНК-зависимой РНК-полимеразы — ранее были сконструированы рекомбинантные нитевидные фаги *M13mp8* и *mWB* [1] и рекомбинантная плазмида *pUC19* [2] со встроенным *BglIII*-*B*-фрагментом космиды *pJC703* [3], содержащем гены *rplI*, *rplL* и *rpoB* (кодирующие рибосомные белки L10, L7/L12 и  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы), а также участок гена *rpoC* ( $\beta'$ -субъединица РНК-полимеразы). Было обнаружено, что при клонировании в нитевидных векторных фагах встраивание вышеуказанного фрагмента происходит в единственной ориентации, так, что направление транскрипции с промоторов *lac* (вектора) и *P<sub>r</sub>* (клонированного фрагмента) совпадает. При клонировании в плазмиде *pUC19* [4] также наблюдалась однонаправленная ориентация [2] встраиваемого фрагмента, но она была противоположной его ориентации в нитевидных фагах [1]. В первом и во втором случаях при отборе рекомбинантных клонов мы использовали то обстоятельство, что встраивание чужеродного фрагмента ДНК в полилинкерную область вектора нарушает структуру гена *lacZ'*. Это приводит к потере голубой окраски на индикаторной среде с ИПТГ (изопропилтиогалактозид) и X-gal (5-бромо-4-хлоро-3-индолл- $\beta$ -D-галактозид) [5] клетками, содержащими рекомбинантную ДНК. Известны, однако, случаи [6, 7], когда совпадение рамки считывания гена *lacZ'* вектора и гена, содержащегося во встроеном фрагменте, может привести к образованию гибридного белка, сохраняющего способность к  $\alpha$ -комплементации [8] и обеспечивающего активность  $\beta$ -галактозидазы, проявляющаяся в голубой окраске клеток *E. coli*, включающих рекомбинантную ДНК. Из анализа нуклеотидной последовательности плазмиды *pUC19* [4] и клонируемого *BglIII*-*B*-фрагмента [9—12] стало очевидно, что при встраивании последнего в *BamHI*-сайт полилинкерной области *pUC19* возможно слияние генов *rpoC'* и *lacZ'* с сохранением рамки считывания и образованием гибридного гена (при клонировании в нитевидных фагах *M13mp8* и *mp9* рамка считывания нарушается). Для проверки этого предположения, т. е. возможной альтернативной ориентации *BglIII*-*B*-фрагмента *pJC703* при конструировании [2] рекомбинантной плазмиды *pUC19*, результатом которого явилось бы образование химерного гена *rpoC'*-*lacZ'*, кодирующего способный к  $\alpha$ -комплементации химерный донорный пептид  $\beta$ -галактозидазы, мы провели анализ полученных ранее [2] клонов *E. coli*, обладающих устойчивостью к ампициллину (кодируемой геном векторной плазмиды *pUC19*) и голубой окраской на среде, содержащей ИПТГ и Z-gal (Z-gal синтезирован в лаборатории А. Г. Терентьева, Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, и является аналогом X-gal). Учитывая, что ген *rpoB*, содержащийся в *BglIII*-*B*-фрагменте *pJC703* (рис. 1), несет доминантную мутацию устойчивости к рифампицину (*rif<sup>r</sup>*) *rpoB3*, голубые клоны *E. coli*, полученные в результате трансформации компетентных клеток *E. coli* JM101 [5] лигазной смесью *BglIII*-гидролизата *pJC703* с *BamIII*-гидролизатом *pUC19*, перекальвали на среду, содержащую 100 мкг/мл рифампицина. В результате этого были отобраны 50 клонов *E. coli*, обладающих *Rif<sup>r</sup>*-фенотипом и голубой окраской. Далее плазмидную ДНК из

этих клонов выделяли по методу [13] и сравнивали ее электрофоретическую подвижность с таковой исходной векторной плазмиды *pUC19*. Нам удалось отобрать лишь один клон *E. coli*, плазмидная ДНК которого ( $\sim 13 \cdot 10^6$ ) превышала массу исходной векторной плазмиды *pUC19* ( $1,77 \cdot 10^6$ ). Остальные клоны содержали плазмиды, не превышавшие по массе векторную, и, следовательно, проявление их  $Rif^r$ -фенотипа обуслов-

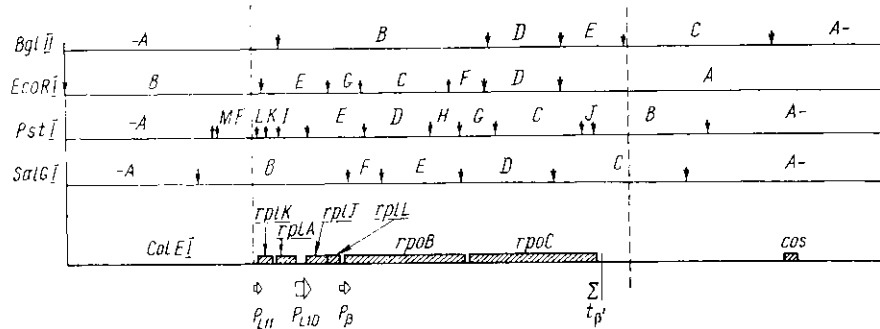


Рис. 1. Рестрикционная карта космиды *pJC703*, построенная по данным [3, 9—12]. Пунктирными линиями ограничен участок с известной первичной структурой  
Fig. 1. Restriction map of *pJC703* cosmid according to [3, 9—12]. Dotted line shows the border of DNA fragment with defined primary structure

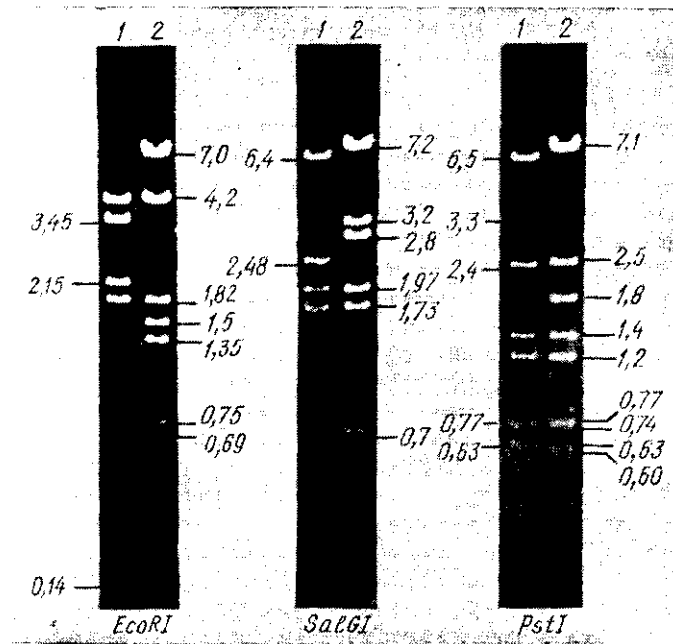


Рис. 2. Электрофорез в 1 %-ном горизонтальном агарозном геле рекомбинантной плазмиды *pUC19/B* (1) и космиды *pJC703* (2), расщепленных рестриктазами *EcoRI*, *SalGI* и *PstI*. Величины фрагментов указаны в млн Да  
Fig. 2. An 1 % horizontal agarose gel electrophoresis of *EcoRI*, *SalGI* and *PstI* cleaved recombinant *pUC19/B* (1) plasmid and *pJC703* cosmid (2). Fragments' lengths are given in mill Da

ливалось спонтанной мутацией устойчивости к рифампицину, происшедшей в гене *rpoB* хромосомы. Частота появления спонтанных  $Rif^r$ -мутантов достаточно высока и составляет  $10^{-7}$ — $10^{-8}$  [14]. Дальнейший анализ полученной нами рекомбинантной плазмиды с массой  $\sim 13 \cdot 10^6$ , названной *pUC19/B*, проводили с помощью расщепления несколькими рестрикционными эндонуклеазами, используя данные о первичной структуре генов *rplJ*, *rplL* [9], *rpoB* [10] и *rpoC* [11, 12], содержащихся в *pJC703* (рис. 1). Зная, что молекулярная масса *pUC19* соответствует  $1,77 \cdot 10^6$ , а космида *pJC703* расщепляется рестриктазой *BglII* на пять фрагментов с молекулярными массами  $7,2 \cdot 10^6$ ,

4,49·10<sup>6</sup>, 3,2·10<sup>6</sup>, 1,57·10<sup>6</sup> и 1,32·10<sup>6</sup>, полученная нами рекомбинантная плазмида *pUC19/B* должна была включать не менее двух *BglIII*-фрагментов *pJC703*. Учитывая Rif<sup>r</sup>-фенотип клона *E. coli*, содержащего плазмиду *pUC19/B*, естественно было предположить наличие в ней *BglIII*-фрагмента *pJC703*, содержащего ген *groB* с доминантной *gii*<sup>r</sup>-мутацией ВЗ. Поскольку молекулярная масса этого фрагмента равна 4,49·10<sup>6</sup>, то вторым *BglIII*-фрагментом *pJC703*, входящим в состав *pUC19/B* скорее всего мог явиться *BglIII*-А-фрагмент, обладающий молекулярной массой 7,2·10<sup>6</sup>. Подтверждение наличия *BglIII*-А- и *BglIII*-В-фрагментов *pJC703* в составе *pUC19/B* и определение их

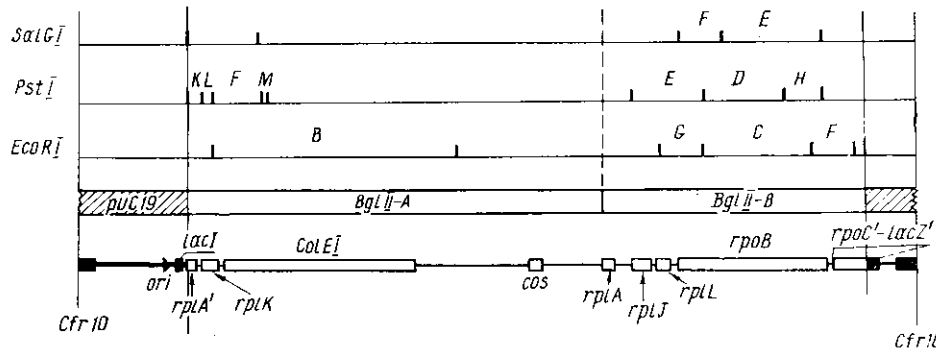


Рис. 3. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды *pUC19/B*. Буквами обозначены фрагменты, общие с *pJC703* (см. рис. 1)  
 Fig. 3. Restriction map of the *pUC19/B* recombinant plasmid. Letters designate fragments common with the *pJC703* cosmid (see Fig. 1)

взаимного расположения было получено сравнительным электрофоретическим анализом продуктов расщепления рестриктазами *EcoRI*, *SalGI* и *PstI* плазмид *pUC19/B* и *pJC703*. На рис. 2 приведена картина, полученная в ходе такого сравнения.

Расщепление полученной рекомбинантной плазмиды *pUC19/B* рестриктазой *EcoRI* приводит к образованию фрагментов с молекулярными массами 4,2·10<sup>6</sup>; 2,12·10<sup>6</sup>; 1,82·10<sup>6</sup>; 0,75·10<sup>6</sup>; 0,69·10<sup>6</sup> и 0,14·10<sup>6</sup>. Исходя из того, что *BglIII*-А-фрагмент расщепляется рестриктазой *EcoRI* на субфрагменты с молекулярными массами 0,35·10<sup>6</sup>, 4,2·10<sup>6</sup> и 2,45·10<sup>6</sup>, а *BglIII*-В-фрагмент — 1,82·10<sup>6</sup>, 1,0·10<sup>6</sup>, 0,75·10<sup>6</sup>, 0,69·10<sup>6</sup> и 0,14·10<sup>6</sup>, наблюдаемые в результате *EcoRI*-расщепления *pUC19/B* фрагменты 3,5·10<sup>6</sup> и 0,14·10<sup>6</sup> могли образоваться при расположении встроившихся *BglIII*-фрагментов А и В, изображенном на рис. 3. Подтверждение этому было получено при сравнении продуктов расщепления *pUC19/B* и *pJC703* рестриктазами *SalGI* и *PstI* (рис. 1 и 2). Таким образом, обнаруженное расположение *BglIII*-фрагментов А и В *pJC703* в составе сконструированной нами плазмиды *pUC19/B* свидетельствует о том, что в месте лигирования *BglIII/BamHI* проксимальная часть гена *rpoC'* встроившегося *BglIII*-В-фрагмента действительно сливается с фрагментом гена *lacZ'* векторной плазмиды с образованием химерного гена *rpoC'-lacZ'*. По данным [11, 12], указанный фрагмент содержит все элементы, необходимые для начала транскрипции гена *rpoC* (а именно промоторы *P<sub>J</sub>*, *P<sub>β</sub>* и *P<sub>β'</sub>*), наличие же *BglIII*-А-фрагмента между промоторами *P<sub>J</sub>* и *lac* (векторной молекулы) позволяет говорить о том, что промотор *lac* не участвует в транскрипции химерного гена *rpoC'-lacZ'*. Свидетельством этого является и наличие голубой окраски рекомбинантных клонов на среде, лишенной индуктора *lac*-промотора — ИПТГ. Что касается терминации трансляции химерного гена *rpoC'-lacZ'*, то по данным о структуре *pUC19* [4] можно заключить, что она, по-видимому, определяется стоп-кодоном, принадлежащим фрагменту ДНК *pBR322*, сочлененному в векторной плазмиде *pUC19* с участком гена *lacZ'*. Все перечисленные выше обстоятельства позволяют считать возможной функциональную активность химерного α-донорного полипептида, кодируемого рекомбинантной плазмидой *pUC19/B*, придающей содержащим ее клеткам *E. coli* способность расщеплять аналог лактозы Z-gal. По данным о нуклеотидной последовательности гена *rpoC* [12] и плазмиды *pUC19* [4] можно заключить, что в образовании α-донорного полипептида, обеспечивающего в результате α-комплементации β-галактозидазную активность в рекомбинантном клоне *E. coli*, участвуют 247 N-концевых аминокислотных остатков, кодируемых геном *rpoC'* и 92 C-концевых аминокислотных остатка, кодируемых геном α-донорного пептида векторной молекулы.

CHIMERIC *rpoC'*-*lacZ'* GENE OF THE RECOMBINANT *pUC19* PLASMID  
RESERVING THE  $\beta$ -GALACTOSIDASE ACTIVITY  
IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

*E. B. Paton, A. N. Zhyvoloup*

Institute of Molecular Biology and Genetics  
of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

A recombinant *pUC19/B* plasmid was obtained with the *pUC19* plasmid and *pJC703* cosmid. The inserted *pJC703 BglIII-B*-fragment codes for rifampicin-resistant *E. coli* RNA polymerase  $\beta$ -subunit. The *rpoC* gene fragment is fused to the vector *lacZ'* gene providing reservation of the  $\beta$ -galactosidase activity in the recombinant cells as a result of chimeric *rpoC'-lacZ'* gene formation.

1. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в интeвидные фаги *M13mp8* и *M13WB2348* // Биоорг. химия.—1984.—10, № 11.—С. 1544—1547.
2. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду *pUC19* // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 4.—С. 217—219.
3. Collins J. Deletions, insertions and rearrangements affecting *rpoB* gene expression // Mol. and Gen. Genet.—1979.—173, N 1.—P. 217—220.
4. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved *M13* phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the *M13mp18* and *pUC19* vectors // Gene.—1985.—33, N 1.—P. 103—119.
5. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (*Ff*) as vectors for recombinant DNA — a review // Ibid.—1982.—19, N 1.—P. 1—10.
6. Close T. J., Christmann J. L., Rodriguez R. L. *M13* bacteriophage and *pUC* plasmids containing DNA inserts but still capable of  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -complementation // Ibid.—1983.—23, N 1.—P. 131—136.
7. Struck D. K., Maratea D., Young R. Purification of hybrid  $\beta$ -galactosidase proteins encoded by *oX174 E lacZ* and *Escherichia coli prtA lacZ*: a general method for the isolation of *lacZ* fusion polypeptides produced in low amounts // J. Mol. and Appl. Genet.—1985.—3, N 1.—P. 18—25.
8. Molecular basis of  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -complementation / K. E. Langley, M. R. Villarejo, A. V. Fowler et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72, N 4.—P. 1254—1257.
9. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit  $\beta$  in *Escherichia coli* / L. F. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura, H. Lewis // Ibid.—1979.—76, N 4.—P. 1697—1701.
10. The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase / Yu. A. Ovchinnikov, G. S. Monastyrskaya, V. V. Gubanov et al. // Eur. J. Biochem.—1981.—116, N 3.—P. 621—629.
11. The primary structure of *E. coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the  $\beta$ -subunit / Yu. A. Ovchinnikov, G. S. Monastyrskaya, V. V. Gubanov et al. // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 13.—P. 4035—4044.
12. Первичная структура фрагмента *EcoRI-D* гена *rpoC* и соответствующей области  $\beta'$ -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* / Г. С. Монастырская, С. О. Гурьев, П. Ф. Калинин и др. // Биоорг. химия.—1982.—8, № 1.—С. 130—134.
13. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.—1979.—7, N 6.—P. 1513—1523.
14. Localization of mutations resulting in rifampicin-resistance of *E. coli* RNA polymerase / S. O. Guryev, G. S. Monastyrskaya, V. V. Gubanov et al. // Chemistry of peptides and proteins / Eds W. Voelter et al.—Berlin: Walter de Gruyter and Co., 1984.—P. 403—411.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,  
Киев

Получено: 25.02.87