



УДК 577.214.625

ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭЛЕМЕНТОВ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ. КЛОНИРОВАНИЕ ТЕРМИНАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ ОПЕРОНА pRНК ИЗ АРХЕБАКТЕРИЙ HALOBACTERIUM HALOBIVM

Е. А. Скрипкин, А. С. Манькин, А. М. Копылов, Ю. Е. Худяков

Введение. В настоящее время создан целый ряд векторных систем, позволяющий изучать не только экспрессию генов в клетках микроорганизмов, но и активность их регуляторных областей. Как правило, такую активность оценивают по количеству образующегося белка либо непосредственно, либо по его ферментативной активности.

Однако количество образующегося белкового продукта зависит от ряда факторов, включающих как эффективность транскрипции и трансляции, так и стабильность полученных мРНК и гибридного белка.

В данной работе представлены векторные системы, содержащие сильный промотор и сильный терминатор транскрипции, позволяющие прямо наблюдать экспрессию коротких гибридных мРНК в клетках кишечной палочки. Использование таких векторов дает возможность решать вопросы, связанные с эффективностью работы промоторов и терминаторов транскрипции и стабильностью образующихся мРНК в клетке.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *E. coli* K12, ΔH1, Δtrp [1], HB101, JM103 [2], эндонуклеазы рестрикции *Bam*III, *Pst*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I, полученные из ВНИИ прикл. энзимологии (Вильнюс) или НИКТИ БАВ (Новосибирск), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* («PL Pharmacia», Швеция); ампициллин и рифампицин («Serva», ФРГ), [α - 32 P]dNTP с удельной активностью более 37 ТБк/ммоль и 32 P-ортофосфорную кислоту производства ВО «Изотоп», Ташкент. Отд-ние. Плазмиды *pCL47* и *pLK53* получены от М. Забо, ФРГ [1].

Бактерии выращивали в среде LB или M9 с добавлением ампициллина до концентрации 100 мкг/мл и в отдельных экспериментах 32 P-ортофосфата до концентрации 3,7 МБк/мл. Генетическую трансформацию, аналитическое выделение плазмидной ДНК кипячением, электрофоретическое разделение фрагментов ДНК и определение размеров сконструированных плазмид в агарозном геле проводили, как описано в [2]. Препаративное выделение плазмид осуществляли по методу [3]. Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Максама — Гилберта [4]. Для выделения меченой РНК клетки лизировали, добавляя равный объем горячего раствора (100 мМ NaCl, 8 мМ ЭДТА, 1 %-ный DS-Na, pH 7,0), в течение 2 мин при 100 °С. Лизат дважды обрабатывали фенолом, насыщенным водой, РНК осаждали спиртом [5]. Транскрипты анализировали при помощи электрофореза в 8 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 8 М мочевины.

Для определения нуклеотидной последовательности РНК выделяли из геля, дефосфорилировали щелочной фосфатазой *E. coli* («Serva», ФРГ). 5'-Концевую метку вводили при помощи [γ - 32 P]АТФ и полинуклеотидкиназы фага Т4 («PL Pharmacia», Швеция). Меченую мРНК очищали электрофорезом в 8 %-ном ПААГ в присутствии

8 М мочевины, элюировали из геля и подвергали частичному расщеплению РНКазами T₁, U₂, РhyM и *Vacillus cereus* («PL Pharmacia», Швеция) по методу [12].

Количество копий мРНК в клетке определяли сравнением суммарной радиоактивности зон из ПААГ рРНК и зоны мРНК при мечении РНК *E. coli in vivo* [³²P]-ортофосфатом в пересчете на один нуклеотидный остаток РНК.

Результаты и обсуждение. Конструирование плазмид. При изучении экспрессии чужеродной генетической информации в виде гибридных генов в бактериальных клетках неизбежно возникает ряд во-

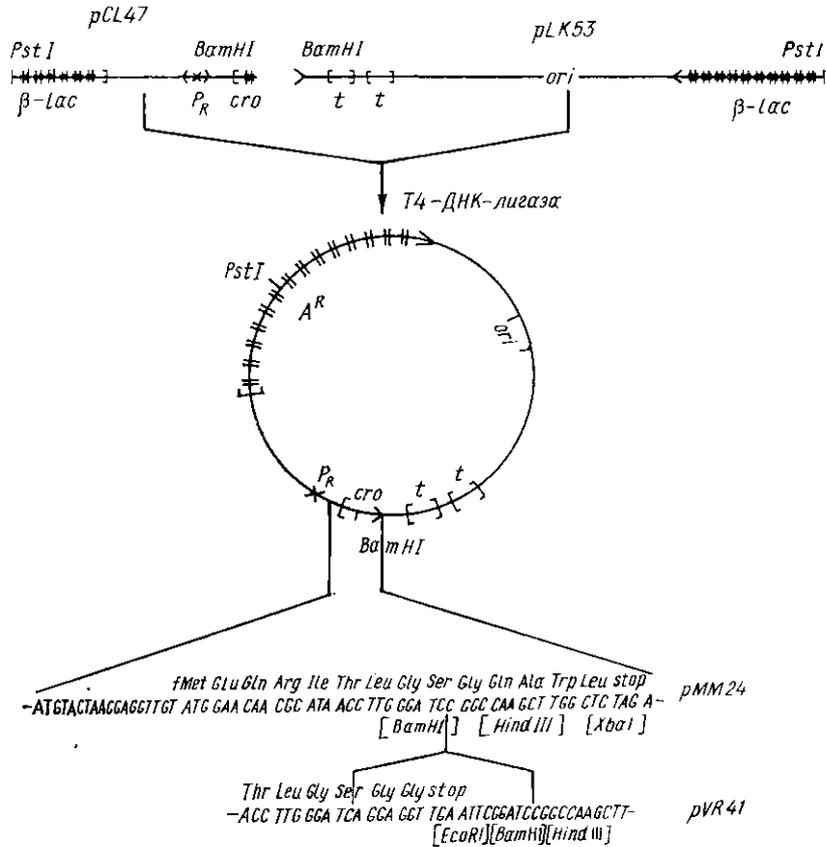


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pMM24 и нуклеотидная последовательность участков плазмид pMM24 и pVR41, кодирующих гибридные пептиды с N-концевым гептапептидом белка λcro

Fig. 1. Construction of the plasmid pMM24 and nucleotide sequence of the regions of the plasmids pMM24 and pVR41 coding for the hybrid peptides which contain N-terminal heptapeptide from the cro-protein

просов, касающихся эффективности транскрипции и стабильности молекул мРНК, а также эффективности трансляции и стабильности белкового продукта. В настоящее время неясно, какая из стадий является определяющей при накоплении белка в штаммах-продуцентах. Для изучения первого этапа экспрессии— транскрипции гена и стабильности полученных мРНК в клетках— нами были сконструированы рекомбинантные плазмиды, содержащие промоторный район P_R бактериофага λ с областями инициации транскрипции и инициации трансляции репрессора λcro, а также участок терминации транскрипции бактериофага fd (два тандемно расположенных терминатора) (рис. 1). Промотор выделяли из плазмиды pCL47 (фрагмент PstI-BamHI, содержащий N-концевую часть гена β-лактамазы и λP_R-промотор); терминирующие структуры взяты из плазмиды pLK53 (фрагмент BamHI-PstI, содержащий C-концевую часть β-лактамазы, участок начала репликации ori плаз-

миды *pBR322* и тандем терминаторов) [1]. На рис. 1 представлена структура полученной плазмиды *pMM24*. Так как плаزمид, полученная в результате лигирования этих двух фрагментов ДНК, должна содержать помимо искусственного мини-гена интактный природный ген β -лактамазы, то селекцию штаммов, содержащих рекомбинантные плазмиды, можно было проводить на среде с ампициллином. Согласно результатам анализа первичной структуры, полученный мини-ген кодирует мРНК длиной около 130 нуклеотидных остатков (н. о.). При трансляции такой мРНК должен синтезироваться олигопептид длиной 14 аминокислотных остатков, из которых первые 7 соответствуют N-концу белка *cro* (рис. 1). При выращивании на средах с радиоактивным ^{32}P -ортофосфатом нами было действительно обнаружено, что в клетках наряду с тРНК и рРНК накапливается значительное количество РНК длиной 129—131 н. о. В аналогичных экспериментах с клетками, не содержащими плазмиду, такого транскрипта обнаружено не было. Прямой анализ нуклеотидной последовательности этой РНК подтвердил, что она является транскриптом сконструированного мини-гена; ее 5'-конец совпадает с точкой инициации транскрипции с λP_R -промотора, а 3'-конец локализован в пределах последовательности олиго-U *fd*-терминатора. Нуклеотидная последовательность ДНК, заключенная между иницирующим ATG- и терминирующим TAG-кодонами, содержит участки узнавания рестриктаз *BamHI*, *HindIII* и *XbaI*. Это дает возможность использовать данную конструкцию для создания генов, кодирующих гибридные полипептиды, содержащие N-конец белка *cro* и любой другой белок в той же рамке трансляции.

Однако при экспрессии чужеродных белков часто возникает потребность в трансляции белка с собственного иницирующего кодона. Для этой цели нами была сконструирована плазмиды *pVR41*, в которой присоединением синтетического адаптора был образован стоп-кодон перед последовательностью полилинкера (рис. 1). Полученная плазмиды *pVR41* под контролем λP_R -промотора определяла синтез короткого транскрипта размером 149 н. о., стабильного в клетках *E. coli*.

Таким образом, сконструированы векторные системы, индуцирующие в клетках синтез коротких мРНК, легко идентифицируемых электрофорезом в ПААГ. Такие системы дают возможность исследовать не только транскрипцию, но и стабильность мРНК. Наличие полилинкера позволяет встраивать в мини-ген фрагменты ДНК, кодирующие структурные области других генов. Кроме того, эти плазмиды могут быть использованы для изучения промоторной или терминаторной функций фрагментов ДНК при встраивании их в полилинкер мини-гена.

Экспрессия коротких мРНК в клетках *E. coli*. Для изучения влияния транскрипта мини-гена на жизнеспособность клеток были использованы системы конститутивного либо индуцированного синтеза РНК с λP_R -промотора. Известно, что транскрипция с промотора λP_R регулируется *cI*-репрессором бактериофага λ . Поэтому при трансформации плазмидами, содержащими λP_R -промотор, штамма *E. coli*, имеющего в геноме интегрированный профаг λ с температурочувствительным репрессором *cI857*, можно регулировать транскрипцию, изменяя температуру. При 28 °С λP_R -промотор репрессирован, с повышением температуры до 42 °С происходит инактивация *cI*-репрессора, в результате чего начинается транскрипция с λP_R -промотора (данный прием удобен для накопления плазмид, несущих гены, экспрессия которых препятствует нормальному развитию клеток). Сравнение скорости роста штаммов *E. coli* ДИ1, содержащего *cI857*-репрессор, и НВ101, не содержащего репрессора, трансформированных плазмидами *pMM24* и *pVR41*, показало, что накопление в клетках коротких мРНК не влияет на жизнеспособность полученных штаммов. Таким образом, исследование транскрипции и стабильности мини-мРНК могло быть проведено в штамме с конститутивным синтезом этого транскрипта, например штамм НВ101.

На рис. 2 показана динамика синтеза мРНК длиной 149 н. о. (мРНК₁₄₉) в клетках *E. coli* HB101: синтез этой мРНК происходит конститутивно. Для сравнения приведена динамика синтеза рРНК в тех же клетках. В конце логарифмической фазы роста содержание мРНК₁₄₉ составляет около 3% по отношению к количеству рибосом в клетке. Следует отметить, что на любой стадии роста культуры относительное количество мРНК₁₄₉ на клетку примерно одинаково — несколько сотен молекул. Для выяснения причины такого высокого уровня

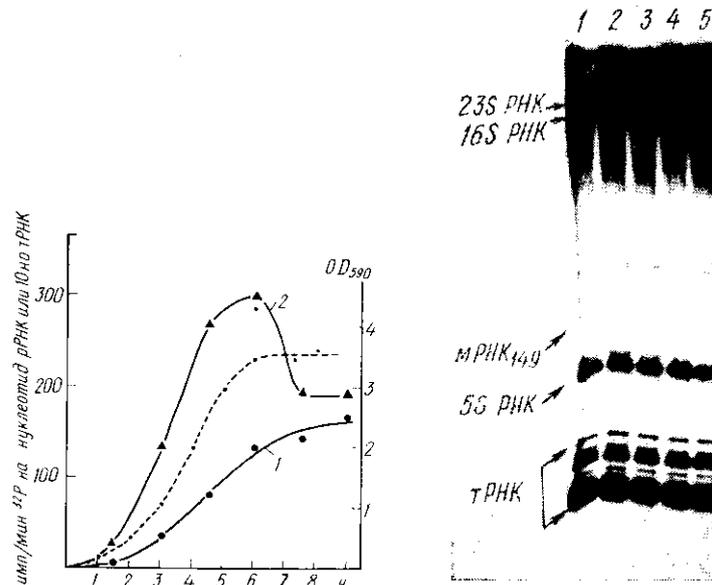


Рис. 2. Кинетика синтеза РНК₁₄₉ в клетках *E. coli*: радиоактивные зоны, соответствующие РНК₁₄₉ (1) и рРНК (2), вырезали из 8%-ного ПААГ и просчитывали в сцинтилляционном счетчике по Черенкову. Аликвоты клеточной суспензии подвергали лизису [5]. Пунктиром представлена кривая роста клеток *E. coli*

Fig. 2. Accumulation of RNA₁₄₉ in the *E. coli* cells. Aliquots of the cell suspensions were lysed [5] and the total cellular RNA were subjected to electrophoresis in a 8% gel. The bands corresponding to RNA₁₄₉ and rRNA were excised from the gel and counted in a scintillation counter. The growth curve is shown by a dotted line

Рис. 3. Стабильность транскрипта плазмиды *pVR41* (149 н. о.) в клетках *E. coli* HB101: клетки выращивали 3 ч (см. кривую роста на рис. 2) на среде LB с добавлением ³²P-ортофосфата (1), затем добавляли рифампицин и отбирали аликвоты через 2 (2), 4 (3); 6 (4) и 20 мин (5)

Fig. 3. The stability of the transcript (RNA₁₄₉) from the *pVR41* plasmid in *E. coli* HB101 cells. The cells were grown for three hours in a LB medium with the addition of ³²P-phosphate (see the growth curve in Fig. 2) (1); after the addition of the rifampicin aliquots were selected each 2 min (2), 4 min (3), 6 min (4) and 20 min (5)

мРНК в клетке — за счет эффективной работы промотора или повышенной устойчивости гибридных мРНК в клетке — изучена скорость деградации полученных матриц. Транскрипцию в клетках останавливали добавлением рифампицина и следили за исчезновением зоны мРНК₁₄₉ после разделения клоточных РНК электрофорезом в ПААГ. Рис. 3 показывает, что время полужизни РНК₁₄₉ составляет 4—6 мин. Это незначительно отличается от обычной скорости деградации молекул мРНК в клетках *E. coli*, например мРНК β-лактамазы, транскрибируемой с плазмиды *pBR322* [6]. Вероятно, наблюдаемый нами уровень мРНК₁₄₉ в клетках поддерживается эффективной работой промотора λP_R на всех фазах роста культуры. Не исключено, что несколько большая стабильность мРНК₁₄₉ определяется ее небольшими, по сравнению с другими мРНК, размерами. Так, для коротких гибридных мРНК длиной 170—200 н. о., транскрибируемых с промоторов генов рибосомных

белков, отмечалось возрастание стабильности по сравнению с исходными мРНК [7].

Клонирование терминатора транскрипции оперона рРНК из архебактерии *H. halobium*. Полученные в работе векторы можно использовать для сравнения эффективно-

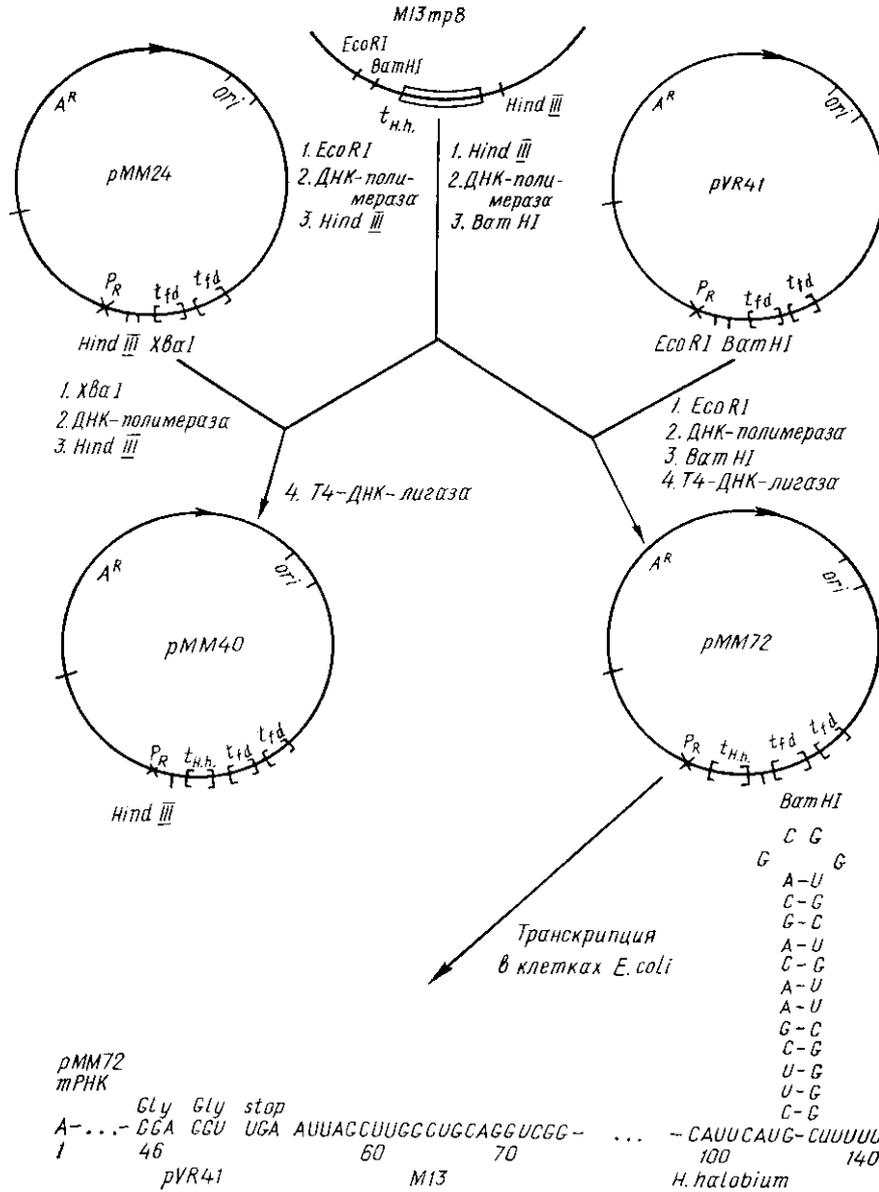
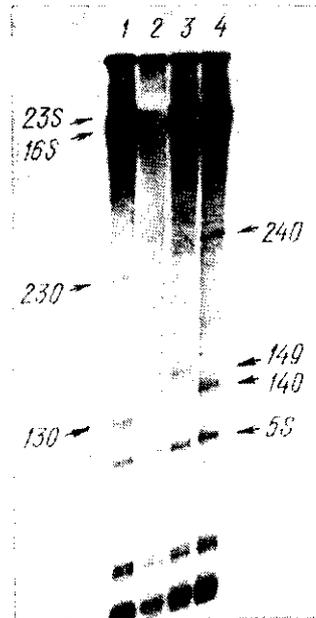


Рис. 4. Схема конструирования плазмид pMM40 и pMM72 и структура участков мРНК плазмиды pMM72, содержащих стоп-кодон и терминаторную шпильку *H. halobium* (*H. h.*)
 Fig. 4. Construction of the pMM40 and pMM72 plasmids. The structure of the pMM72 mRNA containing the stop-codon and the terminator hairpin from *H. halobium* is shown in the bottom of the figure

сти различных промоторов и клонирования последовательностей, терминирующих транскрипцию. Ранее при определении первичной структуры рибосомного оперона архебактерий *H. cutirubrum* [8], *H. volcanii* [9] и *H. halobium* [10, 11] было обнаружено, что после гена 5S рРНК находится структура, похожая на *rho*-независимый терминатор транскрипции бактерий. Хотя механизм терминации транскрипции архебак-

териальных РНК-полимераз неизвестен, было высказано предположение, что именно эта структура может терминировать транскрипцию оперона рРНК. Более того, аналогичная структура найдена и после гена 7S РНК *H. halobium* [10]. Нами сконструированы плазмиды *pMM40* и *pMM72* на основе плазмид *pMM24* и *pVR41* с этой последовательностью, встроенной по полилинкерному участку (рис. 4). Терминатор *H. halobium* выделяли из репликативной формы фага *M13mp8*, в котором был клонирован 110-членный *MspI*-фрагмент оперона рРНК *H. halobium* [11].



Правильность ориентации клонированных фрагментов ДНК определяли при помощи секвенирования плазмид по методу Максама — Гилберта [4]. Структура предполагаемого транскрипта, кодируемого плазмидой *pMM72*, приведена на рис. 4. При анализе транскриптов, синтезируемых в клетках *E. coli* (штамм HB101), трансформированных плазмидой *pMM72* (производной *pVR41*), оказалось, что синтез мини-мРНК терминируется

Рис. 5. Разделение в 8 %-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины РНК из клеток, трансформированных плазмидой *pMM24* (1); *pMM40* (2); *pVR41* (3) и *pMM72* (4). Клетки *E. coli* выращивали на среде М9 в присутствии 32 P-ортофосфата. Положение рРНК и размеры основных мини-мРНК отмечены стрелками

Fig. 5. Electrophoresis in a denaturing 8% gel of the total cellular RNA from cells transformed by plasmids *pMM24* (1), *pMM40* (2), *pVR41* (3) and *pMM72* (4). The size of the main plasmid encoded mini-mRNAs and rRNAs is indicated. The cells were grown in a M9 medium in the presence of 32 P-phosphate

как на архебактериальном, так и на *fd*-терминаторах (рис. 5). При этом на архебактериальном терминаторе завершается синтез около 30% транскриптов с λP_R -промотора. Терминация транскрипции в случае *pMM40* происходит только на терминаторе фага *fd*. Обнаруженные различия можно объяснить тем, что в мини-гене плазмиды *pMM40* открытая рамка трансляции перекрывает всю последовательность терминатора и рибосома, транслирующая мРНК, синтезируемую РНК-полимеразой, может препятствовать образованию структуры терминаторной шпильки. Так как архебактериальная терминирующая шпилька энергетически не менее стабильна, чем терминатор бактериофага *fd*, полная терминация на плазмиде *pMM72*, возможно, также связана с близостью терминатора к стоп-кодону пептида; трансляция останавливается перед полилинкерной последовательностью и препятствует образованию терминаторной шпильки.

Следовательно, клонированные архебактериальные терминаторы синтеза рРНК могут эффективно останавливать транскрипцию, осуществляемую зубактериальной РНК-полимеразой.

Таким образом, сконструированные векторы и система их экспрессии на основе *E. coli* позволяют прямо исследовать процесс транскрипции и эффективность работы регуляторных областей генов, а также изучать сопряжение между транскрипцией и трансляцией.

VECTORS FOR CLONING AND ACTIVITY DETERMINATION OF THE ELEMENTS OF THE BACTERIAL TRANSCRIPTION SYSTEM: CLONING THE TRANSCRIPTION TERMINATOR OF THE rRNA OPERON OF THE ARCHAEABACTERIUM *HALOBACTERIUM HALOBIVM*

E. A. Skripkin, A. S. Mankin, A. M. Kopylov, Yu. E. Khudyakov

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

Summary

The *pBR322* vector was used for constructing recombinant plasmids *pMM24* and *pVR41*, containing the promoter region P_R of the bacteriophage λ including the transcription and translation starting points of the *cro*-repressor, the polylinker with the restriction sites for several restriction enzymes and the tandem of the terminators of the λ phage. The constructed mini-gene is transcribed in *E. coli* cells into the corresponding mini-mRNA. The transcription of this gene could occur either constitutively or under the induction of the *c1857* repressor of the phage λ . The polylinker sequence in the gene body could be used to introduce various regulator structures between the promoter and the terminators. A putative transcription terminator of the rRNA operon from the archaeobacterium *H. halobium* was cloned inside the mini-gene. This archaeobacterial sequence was shown to function as an effective terminator in the eubacterial system.

1. Zabeau M., Stanley K. K. Enhanced expression of *cro*-galactosidase fusion proteins under the control of the P promoter of bacteriophage λ // *EMBO J.*—1982.—1, N 10.—P. 1217—1224.
2. Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—479 с.
3. Mukhopadhyay M., Mandal N. C. A simple procedure for large-scale preparation of pure plasmid DNA from bacteria // *Anal. Biochem.*—1983.—133, N 20.—P. 265—270.
4. Maxam A. M., Gilbert W. Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages // *Meth. Enzymol.*—1980.—65.—P. 499—560.
5. Jinks-Robertson S., Gourse R. L., Nomura M. Expression of rRNA and tRNA genes in *Escherichia coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operon // *Cell.*—1983.—33, N 3.—P. 865—876.
6. Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts / A. von Gabian, J. G. Belasco, J. L. Schottel et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 3.—P. 653—657.
7. Isolation and characterization of stable hybrid mRNA molecules transcribed from ribosomal promoters in *E. coli* / T. Ikemura, S. Itoh, L. E. Post, M. Nomura // *Cell.*—1979.—18, N 3.—P. 895—903.
8. Hui J., Dennis P. P. Characterization of the ribosomal RNA gene cluster in *Halobacterium cutirubrum* // *J. Biol. Chem.*—1985.—260, N 2.—P. 899—906.
9. Sequence of 5S ribosomal RNA gene regions and their products in the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* / C. J. Daniels, J. D. Hofman, J. G. MacWilliam // *Mol. and Gen. Genet.*—1985.—198, N 2.—P. 270—274.
10. Common structural features of the genes for two stable RNAs from *Halobacterium halobium* / A. Moritz, B. Lankat-Buttgereit, H. J. Gross, W. Goebel // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13, N 1.—P. 31—43.
11. Mankin A. S., Kagramanova V. K. A complete nucleotide sequence of the single ribosomal RNA operon of *Halobacterium halobium*. A secondary structure of the archaeobacterial 23S rRNA // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—202, N 1.—P. 152—161.
12. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA // *Nucl. Acids Res.*—1977.—4, N 8.—P. 2527—2539.

МГУ им. М. В. Ломоносова
Ин-т вирусологии им. Д. И. Ивановского
АМН СССР, Москва

Получено 08.04.86