



УДК 577.21

ОРИЕНТАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ПРИСУТСТВИЕМ В ПЛАЗМИДЕ *pUC* ФРАГМЕНТОВ *rplJL-rpoBC*-ОПЕРОНА *ESCHERICHIA COLI*

Е. Б. Патон, И. В. Крупская, А. Н. Живолуп

Явление однонаправленной ориентации фрагментов чужеродной ДНК при встраивании в плазмидные и фаговые векторы описано в [1—3]. Ранее мы сообщали об однонаправленной ориентации фрагментов *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli* при клонировании их в плазмиде *pUC* [4, 5] и фаге *M13* [6]. Подобный эффект при клонировании фрагментов этого оперона отмечался и другими авторами [3]. Показана также невозможность получения рекомбинантных плазмид, включающих отдельные фрагменты вышеуказанного оперона *E. coli*, и летальность для клеток *E. coli* рекомбинантных плазмид, содержащих участки *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli* [7, 8].

Данная работа посвящена исследованию ориентационных эффектов, наблюдаемых при клонировании фрагментов *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli* в плазмиде *pUC*.

Материалы и методы. В работе использовали штамм *E. coli* K-12 JM101 [9]. Клетки *E. coli* культивировали в богатой среде LB [10], включающей дрожжевой экстракт и бакто-триптон, а в случае твердых сред — 1,5 % агар фирмы «Difco» (США). Использован ампициллин отечественного производства. Для получения рекомбинантных плазмид и их рестрикционного анализа использовали рестрикционные эндонуклеазы и ДНК-лигазу фага T4 производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Для электрофореза ДНК применяли агарозные (фирмы «BioRad», США) и полиакриламидные (ПААГ) (фирмы «Merck», ФРГ) гели. Электрофорез проводили по стандартным методикам [11], используя трис-ацетатный буфер. Окрашивали гели раствором бромистого этидия фирмы «Calbiochem» (США). Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* щелочным методом [12], а в случае препаративной наработки проводили равновесное центрифугирование ее в градиенте плотности хлористого цезия (о. с. ч., СССР), как описано в [13]. Фрагменты ДНК выделяли из агарозных гелей электроозлоицей [11], а из акриламидных — по методу [11]. В работе использованы РНКазы фирмы «Worthington» (Англия) и лизоцим фирмы «Serva» (ФРГ). Остальные использованные реактивы были отечественного производства и имели квалификацию х. ч. или о. с. ч.

Получение рекомбинантных плазмид проводили следующим образом. *EcoRI*-фрагменты величиной 1568, 1250 и 1085 пар оснований (п. о.), включающие гены рибосомных белков и промоторы *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli*, выделяли в препаративных количествах после расщепления описанной ранее [4] рекомбинантной плазмиды *pUC19/rpoB* (рис. 1) рестриктазой *EcoRI*. Фрагменты *BspRI* (A и B) получали, расщепляя рестриктазой *BspRI* *EcoRI*-фрагмент (1568 п. о.), содержащий промотор P_{L10} и гены *rplA'*, *rplJ* и *rplL'*. ДНК *pUC18* в случае лигирования с *EcoRI*-фрагментами расщепляли этой же эндонуклеазой, в случае лигирования с *BspRI*-фрагментами ДНК *pUC19* — рестриктазой *SmaI*. Реакцию лигирования в случае «липких» (*EcoRI*) концов проводили в течение 1—2 ч при 20 °С, в случае «тухлых» (*BspRI-SmaI*) — при 14 °С в течение 6—12 ч по стандартной методике [11].

Ca^{2+} -компетентные клетки *E. coli* получали и трансформировали плазмидной ДНК, как указано в [11]. После трансформации клетки *E. coli* высевали на твердую среду LB, содержащую 50 мкг/мл ампициллина, учитывая наличие в *pUC* гена *bla*, Z-gal (10⁻⁴ г/мл), ИПТГ (1,7·10⁻⁶ г/мл), а также присутствие в векторной плазмиде участка *lac*-оперона *E. coli*.

Результаты и обсуждение. Ранее нами показано, что *BglII*-фрагмент *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli* при встраивании в плазмиду *pUC* (в отличие от плазмид *pBR322* и *pHSG415* [14]) и нитевидный фаг *M13* ориентируются однонаправленно [4, 5]. Известно [15, 16], что в состав *rplKAIL-rpoBC*-оперона *E. coli* входят гены, кодирующие синтез рибосомных белков *L11* (*rplK*), *L1* (*rplA*), *L10* (*rplJ*) и *L7/L12* (*rplL*), а также

гены *groV* и *groC*, кодирующие синтез β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*. Транскрипция генов этого оперона направляется двумя сильными P_{L10} (гены *rplK*, *rplA*) и P_{L10} (гены *rplJL*, *groBC*), и двумя слабыми промоторами P_{β} и $P_{\beta'}$.

Известно, что клонирование сильного промотора сопряжено с некоторыми сложностями [17—19]. Встраивание его в определенной ориентации может вызвать интенсивную транскрипцию в область «огі» и привести к потере стабильности рекомбинантов

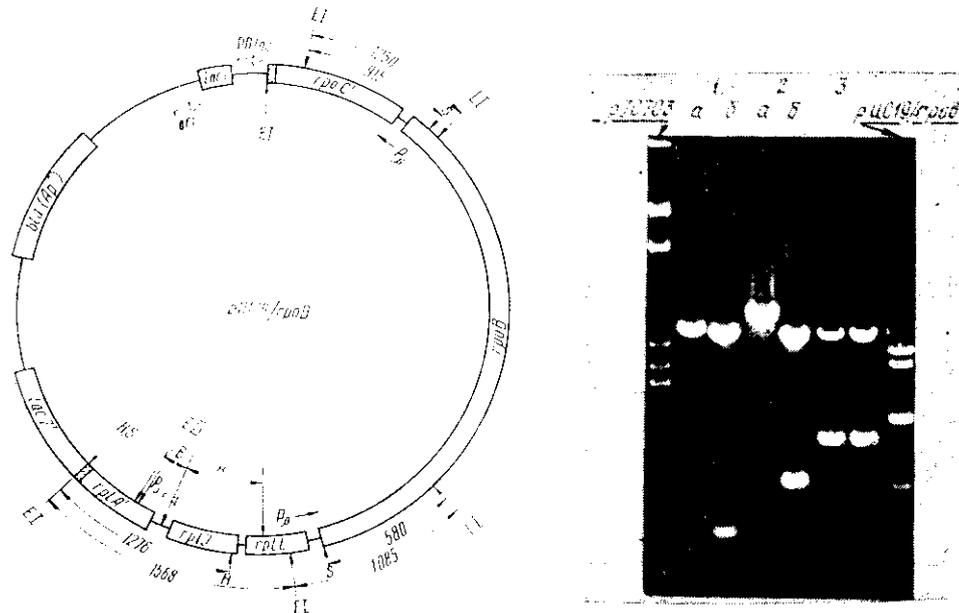


Рис. 1. Физико-генетическая карта плазмиды *pUC19/rpoB* [4]. Стрелками обозначены участки узнавания рестриктазами *EcoRI* (E1), *HindIII* (H), *SalGI* (S1), *Eco47III* (E3). Участки узнавания рестриктазами *EcoRI*, *SalGI* и *HindIII* в полилинкерной области *pUC18* обозначены пунктирными стрелками. Обозначены величины фрагментов в п. о.
Fig. 1. Physical and genetic map of the *pUC19/rpoB* plasmid [4]. Arrows indicate restriction sites for *EcoRI* (E1), *HindIII* (H), *SalGI* (S1), *Eco47III* (E3). Dotted line designates *EcoRI*, *HindIII* and *SalGI* recognition sites in the *pUC18* polylinker area. Fragments' length is given in bp

Рис. 2. Электрофорез в 1 %-ном горизонтальном геле рекомбинантных плазмид *pUC18*, содержащих *EcoRI*-фрагменты 1568 (3), 1250 (2) и 1085 п. о. (1), включающие промоторы P_{L10} , $P_{\beta'}$ и P_{β} соответственно; а, б — альтернативные ориентации клонируемых фрагментов. В качестве маркерных использованы ДНК космиды *pJC703* [4], расщепленная *EcoRI*, и плазмиды *pUC19/rpoB* [4], расщепленная совместно *EcoRI* и *SalGI*
Fig. 2. A 1% horizontal agarose gel electrophoresis of the recombinant *pUC18* plasmids containing 1568 bp (3), 1250 bp (2) and 1085 bp (1) *EcoRI* fragments with promoters P_{L10} , $P_{\beta'}$ and P_{β} , respectively. *EcoRI* digested *pJC703* cosmid [4] DNA and *EcoRI*—*SalGI* double-digested *pUC19/rpoB* plasmid DNA are used as markers. а, б — two orientations of the cloned fragment

вследствие нарушения репликации плазмид. Причиной нестабильности может стать присутствие двух сильных промоторов в такой ориентации, когда транскрипция, инициируемая ими, конвергентна. Ориентационный эффект, вызываемый присутствием сильного промотора, может выражаться и в том, что фрагмент чужеродной ДНК встраивается только в одной, «молчащей», ориентации, при которой транскрипция содержащихся в нем генов невозможна. Показано, что присутствие гена рибосомного белка на мультикопийной плазмиде может вызывать летальный эффект для клеток-хозяев [8]. Учитывая вышеперечисленные обстоятельства, мы предприняли попытку изучения причин замеченных нами ранее ориентационных эффектов [4, 5] путем клонирования в мультикопийной плазмиде *pUC* отдельных фрагментов *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli*.

Для конструирования рекомбинантных плазмид, содержащих фрагменты с промоторами P_{L10} , P_{β} и $P_{\beta'}$, мы использовали полученную нами ранее рекомбинантную плазмиду *pUC19/rpoB*. Как видно на рис. 1, где приведена физико-генетическая карта этой плазмиды, фрагменты ДНК, включающие указанные выше промоторы, можно по-

лучить расщеплением ДНК этой плазмиды рестриктазой *EcoRI*. После гидролиза 50 мкг *pUC19/rpoB* рестриктазой *EcoRI* полученные продукты разделяли электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле и фрагменты *EcoRI-B* (1568 п. о.: гены *rplA'*, *rplJ* и *rplL'* с промотором P_{L10}), *EcoRI-D* (1085 п. о.: *rplL'*, *rpoB'*, промотор P_{β}) и *EcoRI-C* (1250 п. о.: *rpoB'*, *rpoC'*, промотор P_{β}) выделяли из геля электрооэлюзией и обрабатывали по [11]. Конструирование рекомбинантных плазмид описано в разделе «Материалы и методы». Учитывая первичную структуру *pUC18* [20] и клонированных фрагментов [16], дальнейшему анализу подвергали лишь клоны *E. coli*, не обладающие голубой окраской на индикаторной среде с Z-gal и ИПТГ, поскольку при встраивании указанных фрагментов рамка считывания гена *lacZ pUC18* не восстанавливается. При определении ориентации встроенных *EcoRI-B*-, *C*- и *D*-фрагментов (в наличии которых в рекомбинантных плаزمидах убеждались, расщепляя последние рестриктазой *EcoRI* и анализируя продукты расщепления электрофорезом) мы использовали присутствие в указанных фрагментах уникальных и асимметрично расположенных мест узнавания рестриктазой *HindIII* (для *EcoRI-B*-фрагмента) и *SalGI* (для *EcoRI-C*- и *D*-фрагментов) (рис. 1). Полилинкерная область *pUC18* также содержит уникальные места узнавания данными ферментами. Рестрикцииному анализу было подвергнуто 25 клонов *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды со встроенным *EcoRI-B*-фрагментом, и по 30 клонов со встроенными *EcoRI-C*- и *D*-фрагментами. Картина электрофоретического анализа продуктов расщепления рекомбинантных плазмид рестриктазами *HindIII* и *SalGI* свидетельствовала о том, что *EcoRI-B*-фрагмент, в отличие от *C*- и *D*-фрагментов, ориентирован во всех рекомбинантных плазмидах в одном направлении таким образом, что направление транскрипции расположенных на нем генов противоположно направлению транскрипции гена *lacZ'* векторной плазмиды (рис. 2).

Ранее нами описывалась [5] однонаправленная ориентация в плазмиде *pUC18* и невозможность клонирования в плазмиде *pUC19 BglII-EcoRI*-фрагмента *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli*, включающего гены *rplA'*, *rplJ* и *rplL'*. Существуют данные [8] о том, что наличие в клетках *E. coli* мультিকопийной рекомбинантной плазмиды *pGA217*, включающей *HindIII*-фрагмент *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli*, содержащей гены *rplA'* и *rplJ'* (кодирующий белок *L10* с недостающими 20 аминокислотами С-конца), вызывает летальный эффект. Причиной этого является синтез рибосомного белка *L10*, кодируемого такой плазмидой, репрессирующий синтез белка *L7/L12*, кодируемого хромосомальным геном *rplL*, нарушая таким образом сборку рибосомной субъединицы. Показана также [7] невозможность конструирования рекомбинантной плазмиды *pBR322*, включающей *EcoRI*-фрагмент вышеуказанного оперона, содержащий гены *rplK'*, *rplA*, *rplJ* и *rplL'*. С другой стороны, установлено [7], что мутации внутри лидерного района гена *rplJ* (между промотором P_{L10} и началом структурной части гена *rplJ*), регулирующие эффективность трансляции мРНК *rplJ*, снимают летальный эффект, вызываемый наличием в клетках *E. coli* мультিকопийной плазмиды, содержащей ген *rplJ*. С фактом летального эффекта мультিকопийных плазмид, кодирующих синтез белка *L10*, согласуются наши наблюдения (по картине электрофореза) резкого снижения копийности плазмид, содержащих ген *rplJ* в составе *EcoRI*-фрагмента (1568 п. о.) и *BglII-EcoRI*-фрагмента [5], а также замедление скорости роста клеток *E. coli*, содержащих такие плазмиды. Учитывая присутствие в плазмиде *pUC* промотора *lac*, можно предположить, что наблюдаемая нами единственная ориентация *EcoRI*-фрагмента, содержащего ген *rplJ* с промотором P_{L10} , является следствием взаимодействия этих двух промоторов. При данной ориентации промоторы *lac* и P_{L10} инициируют конвергентную транскрипцию, уменьшающую количество мРНК, транскрибируемой с гена *rplJ*, что приводит к уменьшению количества белка *L10* и ослабляет его негативный эффект. Альтернативная ориентация вышеуказанного фрагмента, по-видимому, невозможна, поскольку привела бы к усилению транскрипции *rplJ* и потере жизнеспособности клонов *E. coli*, содержащих такие рекомбинантные плазмиды. В свете вышеперечисленного мы считали целесообразным расчленение *EcoRI*-фрагмента на субфрагменты, включающие отдельно промотор P_{L10} и структурную часть гена *rplJ* и последующее клонирование их в плазмиде *pUC*. Из первичной структуры *rplJL-rpoBC*-оперона *E. coli* [16] можно заключить, что при расщеплении *EcoRI*-фрагмента (1568 п. о.) рестриктазой *BspRI* образуются, в частности, фрагмент *A* (882 п. о.), содержащий лидерный участок и полную структурную часть гена *rplJ*, и *B*-фрагмент (237 п. о.), включающий промотор P_{L10} .

Для встраивания в плазмиду *pUC19 BspRI*-фрагменты *A* и *B* выделяли после разделения их в 10 %-ном ПААГ [11]. Как и в случае *EcoRI*-фрагментов, после конструирования рекомбинантных плазмид и трансформации компетентных клеток *E. coli*

анализу подвергали клоны, утратившие голубую окраску на среде с Z-gal и ИПТГ. Определение ориентации встроенных *BspRI*-фрагментов проводили, анализируя по 20 рекомбинантных плазмид в случае каждого *BspRI*-фрагмента. ДНК рекомбинантных плазмид расщепляли эндонуклеазой рестрикции *BspRI* и сравнивали с продуктами расщепления этим же ферментом векторной плазмиды *pUC19*. Для дальнейшего анализа отбирали плазмиды, молекулярная масса которых превышала на соответствующую величину массу исходной. Определяя ориентацию *BspRI*-А-фрагмента, мы учитывали, что расщепление его рестриктазой *HindIII* дает два фрагмента (622 и 260 п. о.). Учитывая

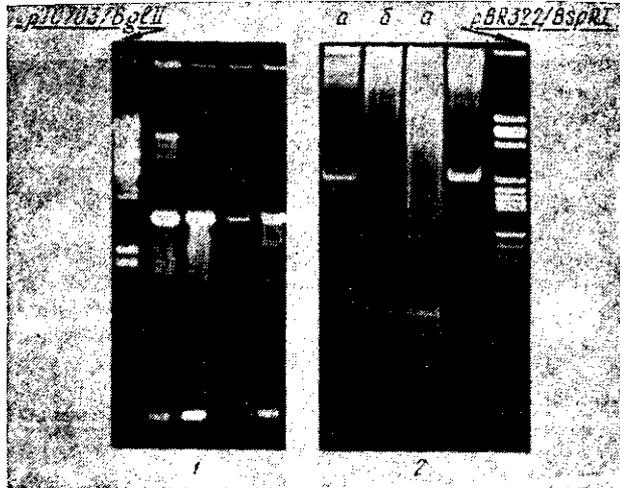


Рис. 3. Электрофорез в 1 %-ном агарозном (1) и 10 %-ном ПААГ (2) расщепленных рестриктазой *HindIII* плазмид *pUC19*, содержащих *BspRI*-А-фрагмент со структурной частью гена *rplI*, и совместно рестриктазами *Eco47III* и *HindIII* плазмид, содержащих *BspRI*-В-фрагмент с промотором P_{L10} в двух ориентациях (а, б). В качестве репера использована плаزمида *pBR322*, расщепленная *BspRI*

Fig. 3. A 1% agarose (1) and 10% PAAG (2) electrophoresis of *HindIII*-digested *pUC19* plasmids with inserted *rplI* gene structural part containing *BspRI*-A-fragment (1), and double

digested by *Eco47III* and *HindIII* *pUC19* recombinant plasmid with the P_{L10} -promoter containing *BspRI*-B-fragment inserted in both orientations (a, b)

наличие уникального участка узнавания *HindIII* на *pUC19*, расщепление рекомбинантных плазмид, включающих *BspRI*-А-фрагмент, могло привести в зависимости от его ориентации в них к образованию *HindIII*-фрагментов величиной 2913 и 655 п. о. или 3275 и 293 п. о. соответственно. Электрофоретический анализ *HindIII*-гидролизатов полученных нами рекомбинантных плазмид (рис. 3) показал, что все они содержат *BspRI*-А-фрагмент в одинаковой ориентации, при которой направление транскрипции генов *rplI* встроеного фрагмента и *lacZ'*-векторной плазмиды противоположно (рис. 3). В случае *BspRI*-В-фрагмента определение ориентации его в рекомбинантных плаزمидях проводили путем расщепления их совместно рестриктазами *Eco47III* и *HindIII*, учитывая наличие уникального участка узнавания *Eco47III* в *BspRI*-В-фрагменте [16] и *HindIII* — в полилинкерной области *pUC19* [20]. При расщеплении рекомбинантных плазмид совместно *Eco47III* и *HindIII* в зависимости от ориентации *BspRI*-В-фрагмента можно было ожидать выщепления *Eco47III*-*HindIII*-фрагментов (264 п. о. или 39 п. о.). Как видно на рис. 3, электрофоретический анализ продуктов расщепления рекомбинантных плазмид показал наличие в них *BspRI*-В-фрагмента в обеих ориентациях.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в рекомбинантной плазмиде *pUC* возможны обе ориентации *BspRI*-В-фрагмента, содержащего промотор P_{L10} , и лишь одна ориентация *BspRI*-А-фрагмента, содержащего структурную часть гена *rplI*. Такая ориентация этого гена при отсутствии промотора P_{L10} , по-видимому, является «молчашей». Альтернативная же ориентация гена *rplI*, вероятно, приводит к инициации транскрипции гена *rplI* с *lac*-промотора векторной плазмиды и синтезу летального для клетки количества белка *L10*. Свидетельством в пользу такого заключения может быть тот факт, что встраивание содержащего структурную часть гена *rplI* *BspRI*-А-фрагмента не ведет к снижению копиности содержащих его рекомбинантных плазмид.

ORIENTATIONAL EFFECTS CAUSED IN THE *pUC* PLASMID
BY *E. COLI* *rplJL-rpoBC*-OPERON FRAGMENTS

E. B. Paton, I. V. Kroupskaya, A. N. Zhyvoloup

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

Summary

A number of recombinant *pUC* plasmids containing *E. coli* *rplJL-rpoBC*-operon fragments were constructed. A *rplJ* gene and P_{L10} promoter containing 1568 bp *EcoRI* fragment and *rplJ* gene structural part containing *BspRI*-A-fragment were found to be oriented in *pUC* plasmids unidirectionally, in such a way that genes *rplJ* of the inserted fragment and *lacZ'* of the vector were transcribed in the opposite direction.

1. *Close T. J., Christman J. L., Rodriguez R. L.* M13 bacteriophage and *pUC* plasmids containing DNA inserts but still capable of β -galactosidase α -complementation // *Gene*.—1983.—23, N 1.—P. 131—136.
2. *Cloning* and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase / P. Davanloo, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, F. W. Studier // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1984.—81, N 7.—P. 2035—2039.
3. *Barry G., Squires C. L., Squires C.* Control features within the *rplJL-rpoBC* transcription unit of *Escherichia coli* // *Ibid.*—1979.—76, N 10.—P. 4922—4926.
4. *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.
5. *Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н.* Особенности клонирования фрагментов *rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в плаزمидях *pUC* // Там же.—1987.—3, № 6.—С. 307—312.
6. *Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д.* Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13mp8* и *M13mWB2348* // *Биоорг. химия*.—1984.—10, № 11.—С. 1544—1547.
7. *Post-transcriptional* regulatory mutants in a ribosomal protein-RNA polymerase operon of *E. coli* / N. P. Füll, J. D. Friesen, W. L. Downing, P. P. Dennis // *Cell*.—1980.—19, N 4.—P. 837—844.
8. *Friesen J. D., An G., Füll N.* The lethal effects of a plasmid resulting from transcriptional readthrough of *rplJ* from the *rplKA* operon in *Escherichia coli* // *Mol. and Gen. Genet.*—1983.—189, N 2.—P. 275—281.
9. *Zinder N. D., Boeke J. D.* The filamentous phage (F_i) as vectors for recombinant DNA — a review // *Gene*.—1982.—19, N 1.—P. 1—10.
10. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—395 с.
11. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* *Molecular cloning — a laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—545 p.
12. *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.
13. *Clewell D. B., Helinski D. R.* Supercoiled circular DNA protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1969.—62, N 3.—P. 1159—1166.
14. *Вудмаска М. И., Патон Е. Б.* Клонирование участка *rplJL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в плазмидях *pBR322* и *pHSG415* // Докл. АН УССР.—1987.—№ 9.—С. 58—62.
15. *Downing W. L., Dennis P. P.* Transcription products from the *rplKAIL-rpoBC* gene cluster // *J. Mol. Biol.*—1987.—194, N 4.—P. 609—620.
16. *Nucleotide* sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit in *Escherichia coli* / L. F. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura, H. Lewis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1979.—76, N 4.—P. 1697—1701.
17. *Stueber D., Bujard H.* Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes // *EMBO J.*—1982.—1, N 11.—P. 1399—1404.
18. *Stassi D. L., Lacks S. A.* Effect of strong promoters on the cloning in *Escherichia coli* of DNA fragments from *Streptococcus pneumoniae* // *Gene*.—1982.—18, N 3.—P. 319—328.
19. *Cloning* and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal / R. Gentz, A. Langner, A. C. Y. Chang et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1981.—78, N 8.—P. 4936—4940.
20. *Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J.* Improved M13 phage cloning vectors and host strains: sequences nucleotide of the *M13mp18* and *pUC19* vectors // *Gene*.—1985.—33, N 1.—P. 103—119.

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

Получено 26.05.87