58. *Roemer D., Buescher H. H., Hill R. C., Maurer R., Petcher T. J., Zeugner H., Benson W., Finner E., Milkowski W., Thies P. W.* Nature, *298*, 5876, 759—760, 1982.
59 *Sawynok J., Penky C., LaBella F. C.* Life Sci., *25*, 19, 1621—1638, 1979.
60 *Schwab L. S.* J. Med. Chem., *23*, 6, 698—702, 1980.
61. *Shaw J. S., Miller L., Turnbull M. J., Gormley J. J., Morley J. S.* Life Sci., *31*, 12—13, 1259—1262, 1982.
62. *Simon E. J.* 7th Congr. Pharmacol., 613, Paris, 1978.
63. *Simon E. J.* Life Sci., *16*, 12, 1795—1800, 1975
64 *Snyder S. H.* Scientific American, T—3, 9, 1813, 44—56, 1977.
65. *Sormley J. J., Morley J. S., Priestley T., Shaw J. S., Turnbull M. J., Wheeler H.* Life Sci., *31*, 12—13, 1263—1266, 1982.
66. *Szmuszkovicz J., Van Volgtlander P. F.* J. Med. Chem., *25*, 10, 1125—1126, 1982.
67. *Takemori A. E., Oka T., Nishiyama N.* J. Pharmacol. exp. therap., *180*, 2, 261—265, 1973.
68. *Ward S. J., Portoghese P. S., Takemori A. E.* Adv. Endog. Opioids, Proc. Int. Nax. Res., Conf., 12th, 229—231, 1981.
69. *Vinogradova N. D., Kuznetsov S. V., Monaenkova S. F., Predtechenskii M. B., Chigareva S. W.* USSR SU 990.759, Otkrytia, Izobret., Prom. Obrazcy, Tovarnye Znaki, 3, 109, 1983.
70. *Zakusov V. V.* In: Opiate receptors and neurochemical correlates of pain, 109—114. Budapest, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 579.262

ФИЗИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ РАЙОН argECBH ХРОМОСОМЫ ESCHERICHIA COLI K-12

И. Л. МЕТТ, А. В. КОЧИКЯН, А. Л. МЕТТ, М. З. АСТВАЦАТРЯН, В. А. САКАНЯН

Осуществлено молекулярное клонирование генов argECBH E. coli K-12 на векторе pBR322. Построена рестрикционная карта плазмиды pALM1, несущей BamHI—фрагмент со всеми генами биполярного оперона argECBH. С помощью различных рестриктаз получены делеционные мутанты плазмиды pALM1, сохранившие, по крайней мере, ген argE. Рекомбинантные плазмиды характеризуются многокопийностью, способностью к амплификации и стабильностью в клетках E. coli. Отмечен «эффект дозы гена» по активности N-ацетилорнитин деацетилазы (продукт гена argE) в экстрактах штамма E. coli, несущего рекомбинантную плазмиду.

Ключевые слова: гены argECBH, молекулярное клонирование, рестрикционная карта.

Аргининовый регулон Escherichia coli K-12 состоит из 10 генов, расположенных в разных местах хромосомы. Четыре гена представлены в виде биполярного оперона argECBH, в котором транскрипция генов argE и argCBH идет в противоположных направлениях с перекрывающегося регуляторного участка ДНК [4]. Транскрипция этих генов находится под контролем репрессора, кодируемого геном argR. В регу-

ляции оперона argECBH аргинин выступает в качестве корепрессора [2].

Нами осуществлено молекулярное клонирование генов argECBH E. coli K-12. Сконструированные рекомбинантные плазмиды представляют собой удобное средство для изучения структурной и функциональной организации генов биполярного оперона argECBH.

Материал и методика. В работе использовали прототрофный штамм E. coli K-12, а также ауксотрофные штаммы E. coli K-12 MA 102 (prc⁻ leu⁻ thr⁻ his⁻ argE⁻ rps L recA) и MA 105 (pur⁻ trp⁻ argH recA).

Измерение активности N-ацетилорнитин деацетилазы проводили согласно описанной методике [5]. Генно-инженерные методики также описаны [3].

ДНК-лигаза фага T4, рестриктазы SalI и BglII получены из Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, г. Пущино-на-Оке; рестриктазы HindIII, XmaI, XhoI, KpnI, PvuII, EcoRI — из БНИИИ прикладной энзимологии, г. Вильнюс.

Рестриктазы BamHI, Sau3A и PstI выделены в нашей лаборатории по общепринятым методикам.

Результаты и обсуждение. Клонирование генов argECBH E. coli K-12. Расщепленную рестриктазой BamHI или EcoRI хромосомную ДНК, выделенную из прототрофного штамма E. coli K-12, сшивали с помощью лигазы с вектором pBR322, расщепленным теми же рестриктазами. Лигированной смесью трансформировали клетки штамма E. coli K-12 MA 102. Трансформанты отбирали на минимальной селективной среде без аргинина и в присутствии ампициллина (Ap, 50 мкг/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл).

В каждом из опытов по клонированию было получено несколько трансформантов. Плазмидные ДНК из всех Arg⁻ Ap^r клонов характеризовались большим молекулярным весом, чем ДНК вектора pBR322. При перетрансформации штамма E. coli K-12 MA 102 плазмидной ДНК приблизительно с одинаково высокой частотой ($2—6 \cdot 10^5$ трансформантов/мкг ДНК) для всех образцов ДНК возникали Arg⁺ Ap^r колонии. Рестрикционный анализ плазмидных ДНК ферментами BamHI или EcoRI, использованными для клонирования, подтвердил их рекомбинантную природу.

Размер EcoRI-вставок колебался в пределах 18,1—21,6 тысячи пар оснований (т. п. о.) у разных плазмид, а BamHI-вставок — 8 т. п. о. Клетки, несущие рекомбинантные плазмиды с BamHI-вставкой, были чувствительны к тетрациклину вследствие инсерционной инактивации tet гена вектора pBR322.

Эти данные свидетельствуют о том, что рекомбинантные плазмиды содержат ген argE.

Трансформация клеток штамма E. coli K-12 MA 105, дефектного по гену argH, образцами как BamHI-, так и EcoRI-рекомбинантных плазмид также дает высокий выход Arg⁺-колоний. Поскольку гены argE и argH являются дистальными в опероне argECBH, можно заключить, что в составе рекомбинантных плазмид отклонирован весь кластер argECBH генов.

Для дальнейшей работы использовали одну из рекомбинантных плазмид, несущую BamHI-фрагмент размером 8,0 т. п. о. Эта плазмида, обозначенная как pALM1, имеет молекулярную длину 12,3 т. п. о.

Рестрикционное картирование плазмиды pALM1. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды pALM1 построена на основании анализа фрагментов, образующихся при расщеплении плазмидной ДНК различными рестриктазами в отдельности и в комбинации друг с другом.

Клонированный BamHI-фрагмент не содержит сайтов расщепления для ферментов XhoI, XmaI, KpnI, EcoRI и PstI, но содержит 1 сайт для BglII, по 2 сайта для HindIII и SalI и 4—5 сайтов для рестриктазы PvuII. Локализация сайтов расщепления ферментами HindIII, SalI и BglII в геноме pALM1 показана на рис. 1.

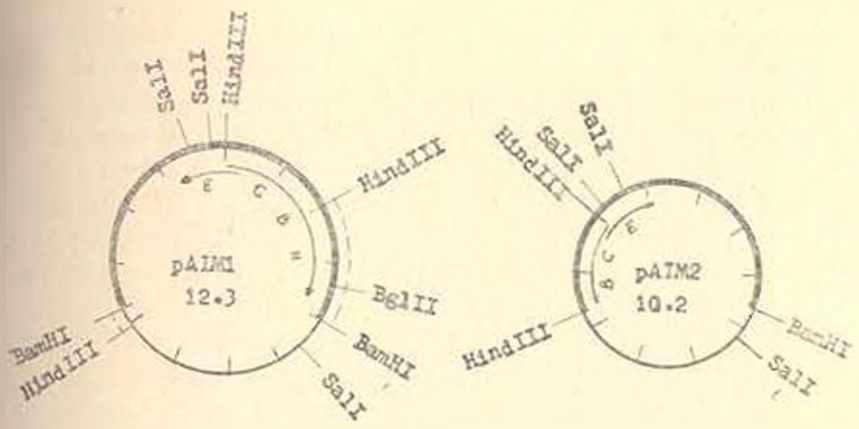

Рис. 1. Рестрикционные карты плазмид pALM1 и pALM2. Тонкой линией обозначена ДНК вектора pBR322, толстой—клонированный BamHI—фрагмент хромосомы, пунктиром—участки, делетированные в геноме pALM2. Стрелками обозначено направление транскрипции генов argE и argCBH по [4]

Генерирование делеций в геноме pALM1. Для удобства последующей работы были получены делеционные мутанты плазмиды pALM1. Один из мутантов генерирован в результате расщепления плазмиды pALM1 одновременно рестриктазами BamHI и HindIII и отбором Arg^- трансформантов в штамме E. coli K-12 MA 102. Плазмидные ДНК, выделенные из нескольких десятков Arg^+ клонов, имели одинаковый молекулярный вес и характеризовались утратой небольшого HindIII/BamHI-фрагмента (~0,3 т. п. о.) вектора и HindIII/BamHI-фрагмента (~1.8 т. п. о.) исходной вставки (рис. 2). К тому же в геноме таких плазмид изменилась ориентация клонированной вставки. Рестрикционная карта одной из делеционных плазмид, обозначенной pALM2, представлена на рис. 1.

Поскольку $argE^+$-плазмида pALM2 (как и все другие делеционные мутанты) сохраняют смежные BamHI/HindIII-фрагмент (4,0 т. п. о.) и HindIII/HindIII-фрагмент (1,8 т. п. о.), то HindIII-сайт, разделяющий эти два фрагмента, расположен в гене argE. Следовательно, плазмида pALM2 возникла либо в результате неполного расщепления по сайтам HindIII генома pALM1, либо в результате лигирования двух указанных смежных фрагментов ДНК с восстановлением интактного гена argE.

Возможно, ген argE инактивируется также в результате расщепле-

ция рестриктазой SalI, так как жизнеспособных ArgE⁺ трансформантов не удалось генерировать при одновременной обработке ДНК pALM1 рестриктазами BamHI/SalI.

Чтобы получить более протяженную делецию с сохранением гена argE, ДНК плазмиды pALM1, неполностью расщепленную рестриктазой Sau3A, переклонировали на векторе pBR322 по BamHI-сайту. В результате среди ArgE⁺ трансформантов обнаружено несколько делеционных вариантов, сохранивших вставки различной длины. Самая маленькая из этих плазмид, обозначенная pALM3, имеет вставку размером ~2,6 т. п. о.

По данным Бени с соавт. [1], ожидаемый размер биполярного оперона argECBH составляет около 5 т. п. о. Поскольку величина вставки в геноме pALM3 значительно меньше указанного размера, в нем не должен присутствовать, по крайней мере, ген argH. Аналогично в HindIII-фрагменте (1,8 т. п. о.) плазмиды pALM2 не могут присутствовать все гены оперона. Эти предположения подтверждаются результатами трансформации штамма E. coli K-12 MA 105 плазмидами pALM2 и pALM3. В отличие от плазмиды pALM1 эти делеционные мутанты не дают ArgH⁺ трансформантов.

Рекомбинантные плазмиды pALM1 и pALM2 стабильно наследуются в штамме E. coli K-12 MA 102 по прошествии более чем 20 генераций. Все три плазмиды—pALM1, pALM2 и pALM3—характеризуются сравнимой с вектором pBR322 копийностью. Кроме того, они амплифицируются при инкубации клеток с хлорамфениколом. Следовательно, у рекомбинантных плазмид pALM1, pALM2 и pALM3 сохранены репликационные функции исходного вектора.

В экстракте клеток штамма E. coli K-12 MA 102, несущего плазмиду pALM2, активность N-ацетилорнитин деацетилазы (продукт гена argE) приблизительно в 10 раз выше, чем в экстракте клеток прототрофного штамма E. coli K-12. Имея в виду многокопийность плазмиды pALM2, повышение активности N-ацетилорнитин деацетилазы может быть объяснено «эффектом дозы гена».

В настоящее время изучается экспрессия генов argECBH оперона в условиях репрессии и дерепрессии и в разном цитоплазматическом окружении.

Научно-исследовательский технологический
институт аминокислот, г. Ереван

Поступило 16.VII 1981 г.

E. coli K-12-Ի ՔՐՈՄՈՍՈՄԻ argECBH ՇՐՋԱՆԸ ԿՐՈՂ ՌԵԿՈՄԲԻՆԱՆՏ ՊԼԱԶՄԻԴՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ

Հ. Լ. ՄԵՏՏ, Ց. Վ. ԴՈԶԻԿՅԱՆ, Ա. Լ. ՄԵՏՏ, Մ. Զ. ԱՍՏՎԱԾԱՏՐՅԱՆ, Վ. Ա. ՍԱՔԱՆՅԱՆ

Իրականացված է E. coli K-*12-ի* argECBH *գեների մուլտիկոպիային կլոնավորումը* pBR322 *վեկտորի վրա։*

Կառուցված է pALM1 *պլազմիդի ռեստրիկցիոն քարտեզը։* pALM1 *պլազմիդը կրում է* BamH1 *հատվածը, որը պարունակում է* argECBH *կրկնարկեն օպերոնի բոլոր գեները։*