

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE SUBSTRATE SPECIFICITY OF RESTRICTION ENDONUCLEASE BcI I

N. V. Tsvetkova, M. M. Mileikovskaya, I. M. Gruber, V. M. Polyachenko, V. V. Butkus, A. A. Janulaitis, O. F. Sudzhiuvene, A. P. Tarasov

A strain producing the new specific restriction endonuclease Bcml has been found

in the *Bacillus* generum. The enzyme has been purified by chromatography on the blue sepharose, phosphocellulose P11, heparinsepharose. The analogous purification has been obtained when the blue sepharose has been substituted for the orange sepharose, the home produced sorbent. The Bcml enzyme has been shown by the substrate specificity definition to be an isozhomer of the restriction endonuclease ClaI.

УДК 579.852.11:579.252:577.214.62

М. Л. Чикиндас, В. Н. Миронов, Е. В. Лукьянов, Ю. Р. Борецкий, Л. С. Арутюнова, П. М. Рабинович, А. И. Степанов

УСТАНОВЛЕНИЕ ГРАНИЦ РИБОФЛАВИНОВОГО ОПЕРОНА *BACILLUS SUBTILIS*

ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Оперон биосинтеза рибофлавина расположен на хромосоме *Bacillus subtilis* в области 210° между маркерами *lys* и *ser* [10]. Ранее проведено клонирование *rib*-оперона в составе 6,3 МД *EcoRI*-фрагмента ДНК в *E. coli* [7] и *B. subtilis* [8]. Определено расположение структурных генов [4], установлено наличие 3 промоторов в составе *rib*-оперона [5, 6].

Целью настоящей работы явилось дальнейшее изучение структуры *rib*-оперона, а именно уточнение его физической карты. В качестве исходного материала использовали плазмиды, содержащие *rib*-оперон с оператором дикого типа *ribO*⁺ и *rib*-оперон, содержащий мутантный оператор *ribO*₃₃₅. В клетках *B. subtilis* оператор *ribO*⁺ определяет репрессию оперона рибофлавином, а оператор *ribO*₃₃₅ — конститутивный синтез рибофлавина. Гены *rib*-оперона *B. subtilis* способны комплементировать мутации в соответствующих *rib*-генах хромосомы *E. coli* [3]. В *E. coli* экспрессия *rib*-оперона практически не зависит от состояния оператора *ribO*.

Материалы и методы

Список штаммов и плазмид представлен в табл. 1 и 2.

Состав сред, методы выделения и анализа плазмидной ДНК, трансформации *B. subtilis* и *E. coli* описаны в предыдущей работе [9]. Выделение хромосомной ДНК *B. subtilis* осуществляли по методу, предложенному J. Maguir [12]. Перенос ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозные фильтры, получение [³²P]-ДНК и ДНК-ДНК-гибридизацию проводили в соответствии с описанными методами [1]. Используемые в работе рестриктазы получены от Б. А. Ребенгиша (ВНИИгенетика), полинуклеотидлигаза фа-

га Т4 — от А. С. Солонина (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР).

Результаты и обсуждение

Плаزمида pLP102 содержит *rib*-оперон дикого типа в составе 6,3 МД *EcoRI*-фрагмента ДНК *B. subtilis*, клонированного на pBR322; плазмида pLA44 — конститутивный *rib*-оперон на челночном векторе pLA110 и способна реплицироваться в *B. subtilis* и *E. coli* [8]. Ранее установлено, что первый структурный ген *rib*-оперона *ribG*, кодирующий фермент дезаминазу, содержит сайт *PstI* [3]. Рестрикционный анализ ДНК pLP102 показал, что сайт *PstI* находится внутри 1,3 МД *BglII*-фрагмента (рис. 1). Следовало определить положение *BglII*-сайтов на генетической карте *rib*-опе-

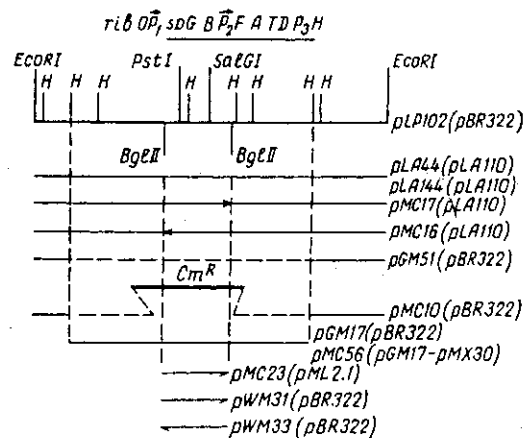


Рис. 1. Плазмиды, использованные в работе. H — сайты *HindIII*; тонкая линия — ДНК *B. subtilis*; жирная линия — ДНК pC194; пунктир — область делеции ДНК *B. subtilis*; в скобках указан вектор.

Таблица 1

Штаммы, использованные в работе

Штамм	Характеристика	Откуда получен
<i>B. subtilis</i> SHgW 107 PG260 110 ribG recE CHP629 CHP1038 MC10	Прототроф ribD ₁₀₇ ribD ₁₀₇ recE ₄ ribB ₁₁₀ ribG ₈₅₀ recE ₄ ribA ₄₂₉ ribH ₁₆ Cm ^R Rib ⁻ (Δ Rib)	Т. П. Черник, ВНИИгенетика То же » » » » » » » » Получен в данной работе
<i>E. coli</i> HB101	thi, pro, leu, hsdR ⁻ , hsdM ⁻ , recA, ara, lacI, gal, xyl, mtI, rpsL20 (Sm ^R), supE44	Музей ВНИИгенетики
802-6	met, rib	Г. М. Шавловский, Львовский уни- верситет
802-28	met, rib	То же
BSV13	rib::Tn5, thy	Музей ВНИИгенетики

рона. Для этого проведено клонирование 1,3 МД BglII-фрагмента рLP102 путем его интеграции в BamHI-сайт рBR322. В результате получены плазмиды рWM31 и рWM33 (см. рис. 1). Транскрипция генов, интегрированных в BamHI-сайт рBR322, может осуществляться с промотора tet-гена вектора. Плазмиды рWM31 и рWM33 различаются ориентацией вставки относительно tet-промотора. Плаزمида рWM31 с прямой ориентацией вставки комплемент-

тирует мутацию *E. coli* 802-6, нарушающую ген дезаминазы, а плазмида рWM33 (с противоположной ориентацией вставки) — нет. Можно предположить, что клонированный 1,3 МД BglII-фрагмент ДНК не содержит промотора гена ribG. Плазмиды рWM31 и рWM33 комплементируют мутации *E. coli* 802-28 и BSV13, нарушающие ген рибофлавинсинтетазы, аналогичный гену ribB *B. subtilis*. Следовательно, можно предположить, что транскрипция гена ribB осуществляет-

Таблица 2

Плазмиды, использованные в работе

Плазмиды	Характеристика	Откуда получена
рBR322	Ap ^R Tc ^R	Музей ВНИИгенетики
рC194	Cm ^R	То же
рML2.1	Ap ^R Cm ^R	С. В. Машко, ВНИИгенетика
рMX30	Em ^R	Музей ВНИИгенетики
рLA110	Ap ^R Em ^R (ΔрMX30-рBR322)	Л. С. Арутюнова, ВНИИгенетика
рLA44	рLA110-rib оперон (O ^c)	То же
рLA144	рLA110-rib оперон (O ⁺)	» »
рLP102	рBR322-rib оперон (O ⁺)	Музей ВНИИгенетики
рGM51	рLP102Δrib оперон	То же
рGM17	рBR322-rib оперон (O ⁺); ΔрLP102	» »
рWM31	рBR322 (Ap ^R)-rib (GBΔF)	Получена в данной работе
рWM33	рBR322 (Ap ^R)-rib (ΔFBG)	То же
рMC15	рLA110-rib (O ^c ΔFATDH); ΔрLA44	» »
рMC16	рLA110-rib (O ^c BGATDH)	» »
рMC17	рLA110-rib (O ^c GBFATDH)	» »
рMC23	рML2.1-rib (GBΔF)	» »
рMC10	рGM51-рC194	» »
рMC56	рGM17-рMX30	» »

ся с промотора, расположенного внутри 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК. Для проверки этих предположений сконструировали плазмиды, способные реплицироваться как в *E. coli*, так и в *B. subtilis* и содержащие 1,3 МД BglII-фрагмент ДНК в составе *rib*-оперона в 2 ориентациях.

ДНК рLA44 (*ribO*^o) обработали BglII, лигазой и использовали для трансформации штамма *E. coli* 802-28. Трансформанты отбирали по признакам Ap^RRib⁻. Рестрикционный анализ плазмиды рМС15, выделенной из трансформаторов, показал, что она утратила 1,3 МД BglII-фрагмент ДНК. В плазмиду рМС15 вновь интегрировали 1,3 МД BglII-фрагмент, но из *rib*-оперона дикого типа (*ribO*⁺), выделенный из плазмиды рLP102. Для этого ДНК рМС15 и рLP102 обработали BglII, лигазой и использовали для трансформации *E. coli* 802-28 по признакам Ap^RRib⁺. Далее отобрали клоны, чувствительные к тетрациклину, так как рМС15 в отличие от рLP102 не несет детерминанты Tc^R. Из 2 Ap^RTc^SRib⁺-клонов выделены плазмиды: рМС17 — с прямой ориентацией и рМС16 — с обратной ориентацией вставки 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК рLP102 в рМС15. ДНК рМС15, рМС16 и рМС17 использованы для трансформации *rib*-ауксотрофов *B. subtilis*.

Плазмиды рМС17, содержащая «восстановленный» *rib*-оперон, комплементирует мутации в генах *ribG*, *ribB*, *ribA* и *ribD*. Плазмиды рМС16 с инверсией 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК не комплементирует ни одну из перечисленных выше мутаций. Плазмиды рМС15 с делегированным 1,3 МД BglII-фрагментом ДНК комплементирует мутации в генах *ribA* и *ribD*, но не комплементирует мутации в генах *ribG* и *ribB*. С учетом взаимного положения *rib*-генов (см. рис. 1) это означает следующее.

1. 1,3 МД BglII-фрагмент ДНК, содержащий гены *ribG* и *ribB*, не содержит промотора (p1), необходимого для транскрипции этих генов в *B. subtilis*. Экспрессия гена *ribB* в составе 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК в *E. coli*, по-видимому, связана с наличием перед этим геном промотора, не функционирующего в бактериях.

2. Транскрипция генов *ribA* и *ribD* в *B. subtilis* осуществляется с промотора, расположенного внутри 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК или левее этого фрагмента.

Для дальнейшего изучения структуры *rib*-оперона проведено клонирование 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК рLP102 на векторе рML2.1. Плазмиды рML2.1 содержат регуляторную область гена *lacZ* и расположенный внутри этой области, пригодный для клонирования сайт BamHI. Существенно, что промотор и оператор *lacZ* расположены по одну сторону от сайта BamHI, а SD-последовательность — по другую [2]. ДНК рLP102 обработали BglII и объединили с ДНК рML2.1, линеаризованной BamHI. После лигирования препарат использовали для трансформации *E. coli* 802-6 с отбором по признакам Ap^RRib⁺. В результате получена плазмиды рМС23 (см. рис. 1), содержащая 1,3 МД BglII-фрагмент ДНК в прямой ориентации относительно *lac*-промотора. рМС23 комплементирует ауксотрофию мутантного по гену дезаминазы штамма *E. coli* 802-6. Следует заключить, что клонированный 1,3 МД BglII-фрагмент ДНК содержит SD-последовательность гена *ribG*.

Ранее установлено, что оператор рибофлавинового оперона расположен левее сайта PstI [4]. Для локализации оператора относительно сайта BglII проанализировали свойства плазмиды рМС17, которая получена в результате замены 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК конститутивного *rib*-оперона (рLA44) на аналогичный фрагмент ДНК оперона дикого типа (рLP102). Если мутация *ribO*₃₃₅ расположена за пределами 1,3 МД BglII-фрагмента, рМС17 должна сохранить конститутивный фенотип родительской плазмиды рLA44; в противном случае она должна приобрести дикий фенотип. Для контрольного опыта было необходимо также иметь плазмиду, аналогичную рLA44, но содержащую *rib*-оперон дикого типа. Такая плазмиды — рLA144 — получена путем клонирования 6,3 МД EcoRI-фрагмента рLP102 на векторе рLA110.

ДНК плазмид рLA44 (*ribO*^o), рLA144 (*ribO*⁺) и рМС17 (гибридный *rib*-оперон) использовали для трансформации *B. subtilis* PG260. Клетки, трансформированные рLA44 и рМС17, в отличие от трансформированных рLA144 способны к сверхсинтезу рибофлавина (табл. 3). Сохранение конститутивного типа биосинтеза рибофлавина у рМС17 свидетельствует о том, что мутация *ribO*₃₃₅ расположена за пределами 1,3 МД BglII-фрагмента ДНК. Поскольку опе-

Таблица 3
Синтез рибофлавина клетками *B. subtilis* PG260, содержащими плазмиды

Плаزمида	OD ₅₄₀ через 10 ч инкубации	Синтез рибофлавина, мкг/мл	
		через 10 ч инкубации	через 25 ч инкубации
pLA144	1,32	0	0
pLA44	0,66	21	33
pMC17	2,04	29	54

ратор *gibO* расположен левее сайта *PstI*, следует заключить, что он, так же как и промотор гена *gibG*, расположен слева от 1,3 МД *BglII*-фрагмента ДНК (см. рис. 1). Это подтверждает предположение, что область перед геном *gibG* содержит главный (регулируемый оператором *gibO*) промотор *gib*-оперона [5].

Второй промотор *gib*-оперона (р2) ранее локализован в *SalGI* — *HindIII*-фрагменте перед геном *gibF*, а третий промотор (р3) — в *HindIII* С-фрагменте pLP102 за геном *gibT* [5]. Поскольку инверсия 1,3 МД *BglII*-фрагмента нарушает экспрессию гена *gibA*, расположенного между генами *gibF* и *gibT*, следует заключить, что промотор р2 расположен между сайтами *SalGI* и *BglII*, как это показано на рис. 1. Отсутствие экспрессии гена *gibD* на плазмиде pMC16 указывает на то, что третий промотор (р3) обеспечивает транскрипцию только гена *gibH*.

Для установления правой границы *gib*-оперона проведен анализ делеций в хромосоме *B. subtilis*, полученных с помощью генной конверсии. Плазмиды, использованные в этих экспериментах, изображены на рис. 1. ДНК pGM51 содержит фланговые области 6,3 МД *EcoRI*-фрагмента ДНК pLP102 и вектор pBR322. В ДНК pGM51 вместо делегированного *gib*-оперона интегрировали 2 МД плазмиду pC194(*Sm^R*) по сайту *HindIII*. В результате получена плаزمида pMC10. Плазмиды pC194 способна к автономной репликации в бациллах. Эта способность, однако, исчезает, если плазмидная ДНК переводится в линейную форму, например после обработки рестриктазами [11]. ДНК pMC10 линеаризовали по сайту *BamHI*, расположенному в сегменте pBR322, и использовали для трансформации прототрофного штамма *B. subtilis* SHgW. Все *Sm^R*-трансформанты оказались

ауксотрофами по рибофлавино. Один из *Sm^R* *Rib⁻*-клонов, обозначенный символом MC10, использован для определения положения *Sm^R*-маркера в составе хромосомы, так как этот штамм не содержал автономной плазмидной ДНК. Хромосомную ДНК *B. subtilis* MC10 фрагментировали *EcoRI* и гибридовали с меченой [³²P]-ДНК pC194. Вся метка обнаруживалась в области фрагментов с мол. массой 4 МД (рис. 2, см. на вклейке). Это соответствует величине *EcoRI*-фрагмента pMC10, содержащего pC194. Полученные данные свидетельствуют о том, что штамм *B. subtilis* MC10 образован в результате замещения области *gib*-оперона SHgW на *EcoRI*-фрагмент pMC10, содержащий последовательность pC194.

Штамм *B. subtilis* MC10 трансформируется к прототрофности плазмидой pLP102. Плазмиды pGM17, которая содержит фрагмент ДНК *B. subtilis*, делегированный у *B. subtilis* MC10, не способна к трансформации этого штамма. Однако, если ДНК pGM17 объединяется с репликоном pMX30, способным к автономной репликации в *B. subtilis*, то полученная таким образом плазмиды pMC56 комплементирует ауксотрофность *B. subtilis* MC10. Ранее установлено, что мутация *gibH₁₆*, нарушающая дистальный ген *gib*-оперона, расположена в *HindIII* С-фрагменте pLP102 [3]. Возможность комплементации *gib*-ауксотрофности *B. subtilis* MC10 плазмидой pMC56, по-видимому, означает, что ген *gibH* сохранен в составе плазмиды в неповрежденном виде, т. е. целиком расположен в *HindIII* С-фрагменте pLP102. Полученные результаты позволяют заключить, что структурные гены *gib*-оперона расположены в составе 2,8 МД *BglII*-*HindIII*-фрагмента ДНК *B. subtilis*, как это показано на рис. 1.

Авторы работы выражают благодарность проф. Г. М. Шавловскому за предоставленные штаммы *E. coli* и д-ру Д. А. Перумову за участие в обсуждении результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатас Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. — М., 1984. — С. 171—172.
2. Машико С. В., Лебедева М. И., Подковыров С. М. и др. // Молекул. биол. — 1984. — № 5. — С. 1194—1205.

3. Морозов Г. И., Рабинович П. М., Бандрин С. В. и др. // Молекул. генетика. — 1984. — № 7. — С. 42—46.
4. Морозов Г. И., Рабинович П. М., Степанов А. И. // Там же. — 1984. — № 11. — С. 11—16.
5. Морозов Г. И., Рабинович П. М., Емельянов В. В. и др. // Там же. — 1985. — № 12. — С. 14—19.
6. Осина Н. К., Каламбет Ю. А., Александров А. А. // Докл. АН СССР. — 1985. — Т. 284. — № 3. — С. 737—740.
7. Пакина Л. И., Йомантас Ю. В., Хайкинсон М. Я. и др. // Генетика. — 1983. — № 1. — С. 174—176.
8. Степанов А. И., Рабинович П. М., Хайкинсон М. Я. и др. // Биотехнология. — 1986. — № 1. — С. 11—16.
9. Чикиндас М. Л., Лукьянов Е. В., Рабинович П. М. и др. // Молекул. генетика. — 1987. — № 2. — С. 20—24.
10. Heuner D. J., Hoch J. A. // The Molecular Biology of the Bacilli / Ed. D. Dubnau. — New York, 1982. — P. 1—33.
11. Iglesias A., Bensi G., Canossi U., Traut-

- ner T. A. // Molec. gen. Genet. — 1981. — Vol. 184. — P. 405—409.
12. Marmur J. // J. molec. Biol. — 1961. — Vol. 3. — P. 208—218.

Поступила 23.06.86

DETERMINING THE RIBOFLAVIN OPERON BOUNDS IN *BACILLUS SUBTILIS*

M. L. Chikindas, V. N. Mironov, E. V. Lukyanov, Ya. R. Boretsky, L. S. Arutyunova, P. M. Rabinovich, A. I. Stepanov

All the structural genes of riboflavin biosynthesis are shown to be located on the 2,8 MD DNA fragment, using the collection of plasmids, carrying the *Bacillus subtilis* riboflavin operon fragments and *Bacillus subtilis* strains, containing various deletions of rib-operon for analysis. The proximal Bgl II site is shown to be located between promoter P₁ and the first structural gene ribG. The distal Hind III site of fragment C is the left bound of the rib-operon.

УДК 579.843.1:615.919:[579.252.5:579.255]

Н. В. Янишевский, А. Л. Гинцбург, Ю. В. Вертнев, Е. Ю. Демме, Г. И. Каратаев, Г. Б. Смирнов

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, КОДИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. П. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Известно, что холерный токсин (СТ) является основным фактором патогенности *Vibrio cholerae*. Молекула СТ состоит из 1 субъединицы А (СТА) и 5 субъединиц В (СТВ). СТВ связывается с ганглиозидом Gm₁, находящимся на поверхности эпителия тонкого кишечника, а СТА активирует систему «мембранная аденилатциклаза + сАМР». Действие СТ определяет основной симптомокомплекс заболевания — диарейный синдром [6, 7].

Один из подходов к созданию эффективных профилактических препаратов против инфекций, вызванных *V. cholerae*, заключается в использовании СТВ для индукции антитоксического иммунитета. СТВ самопроизвольно агрегирует в пентамеры и является сильным антигеном [6, 7]. Она не обладает токсической активностью, но способна специфически адсорбироваться на поверхности эпителия тонкого кишечника и стимулировать локальный иммунный ответ. При иммунизации СТ токсинейтрализующие антитела образуются преимущественно к СТВ [8, 9]. Все это свидетельствует о перспективности использования СТВ в качестве иммуни-

зирующего агента при конструировании вакцин против *V. cholerae*.

Ранее нами было проведено клонирование оперона холерного токсина [1] и изучены структурная организация и выражение генов, кодирующих биосинтез СТ, в составе рекомбинантных плазмид. Цель настоящей работы заключается в создании плазмид, детерминирующих биосинтез СТВ.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Плазмидную ДНК выделяли щелочным методом с последующим переосаждением полиэтиленгликолем и очисткой в перфорированном градиенте хлористого цезия [1, 2].

Обработку ДНК рестрикционными эндонуклеазами, лигирование рестрикционных фрагментов, трансформацию бактериальных клеток и электрофорез фрагментов ДНК проводили согласно методам, изложенным в руководстве по геной инженерии [2].

Получение зондов описано нами ранее [1]. LTV-зонд представляет собой меченный с помощью [³²P]-СТР EcoRI-HindIII-фрагмент плазмиды pLT307, содержащий ген В-субъединицы термостабильного токсина *E. coli*.

Перенос на нитроцеллюлозные фильтры выполняли по методу E. Southern [12].

ДНК-ДНК-гибридизацию проводили в «мягких» условиях, способствующих образо-