

Биология

УДК 577.21

А. Н. АРЗУМАНЯН

КЛОНИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА
АЦЕТИЛОРНИТИН-ДЕАЦЕТИЛАЗЫ В ПЛАЗМИДНОМ
ВЕКТОРЕ, СПОСОБНОМ ТРАНСФОРМИРОВАТЬ КЛЕТКИ
ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Осуществлено клонирование некоторых генов биосинтеза аргинина, в том числе гена *argE* термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* на вектор *pGK8*, способный трансформировать растительные протопласты. Сконструированная новая рекомбинантная плазмида *pGK8-arg3* может использоваться для изучения особенностей экспрессии бактериальных генов в растительных клетках.

В последние годы в генно-инженерных исследованиях растительных клеток широкое применение находят Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Перенос и стабильное поддержание Ti-плазмиды в растительных клетках обуславливается интеграцией ее Т-ДНК в ядерную ДНК растительного хозяина [1].

Для экспрессии чужеродных генов в растительной клетке используются эукариотические промоторы (генов нопалинсинтетазы, октопинсинтетазы и др.). В растительных клетках под контролем промотора гена нопалинсинтетазы (*nos*), включенного в район Т-ДНК, была осуществлена экспрессия некоторых бактериальных генов, например, генов аминокликозидфосфотрансферазы (*APH II*) и неомицинфотрансферазы (*NPT I* и *NPT II*), обуславливающих устойчивость к канамицину [2], гена метотрексатустойчивой дегидрофолатредуктазы (*DHFR Mtx^r*) из транспозона *Tn 7* [3], гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы из плазмиды, обеспечивающей устойчивость к хлорамфениколу [1, 4], гена *bt2*, ответственного за синтез инсектицидного белка *Bacillus thuringiensis* [5].

В то же время до сих пор нет информации о возможности экспрессии в растительных клетках бактериальных генов биосинтеза аминокислот. Уместно отметить, что разработка методов, позволяющих направленно изменять аминокислотный состав высших растений, имеет важное прикладное значение. Первые эксперименты в этом направлении осуществлены американскими исследователями, перенесшими ген *opaque 2* в кукурузу с целью повышения питательной ценности зерен аминокислотой лизином [6].

В настоящей работе представлены первые результаты по переносу бактериальных генов биосинтеза аргинина на вектор, пригодный для последующего переноса в растительные клетки.

Материал и методика. Источником генов биосинтеза аргинина тер-

мофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* служила рекомбинантная плазмида рAVK3, сконструированная в лаборатории генной инженерии Научно-исследовательского технологического института аминокислот (НИИИА). Клонирование вышеуказанных генов осуществляли в векторе рGK8, полученном из лаборатории молекулярной генетики растений Института молекулярной генетики АН СССР.

Отбор конструированных в настоящей работе плазмид вели в штамме *E. coli* K-12 XS1D2 *recA* на минимальной среде M9 [7] с необходимыми добавками. Генетическая характеристика штамма XS1D2 *recA*—*argE* *naLA* *groB* *hsdR*(λ)⁺ *recA* *srL*::Tn 10. Этот штамм устойчив к налидиксовой кислоте (*naLA*), к рифампицину (*groB*), тетрациклину (вследствие присутствия в хромосоме транспозона Tn10).

Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса [8].

Трансформацию кальцинированных клеток *E. coli* плазмидной ДНК проводили по методу Манделя и Хига [9]. Полученные компетентные клетки выдерживали при 4°C в течение 12—24 ч для повышения эффективности трансформации [10].

Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами осуществляли в универсальном буфере следующего состава: 6 мМ MgCl₂, 40 мМ Трис-HCl (pH-7,5), 6 мМ NaCl, 6 мМ дитиотрейтол. Для инактивации рестриктаз реакционную смесь прогревали при 68°C в течение 10—15 мин. Лигирование проводили в буфере состава 50 мМ Трис (pH 7,4), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрейтол, 1 мМ спермидин, 1 мМ АТФ с использованием полинуклеотид-лигазы фага T4 [7].

Анализ ДНК проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (0,7—0,8%), приготовленном на трис-ацетатном буфере при напряженности 5 В/см. В качестве маркера для определения размеров фрагментов использовали ДНК фага λ , расщепленную рестриктазами Hind III или Pst I. После электрофореза гель прокрашивали бромистым этидием (2—3 мкг/мл) и фотографировали в ультрафиолетовом свете через оранжевый фильтр.

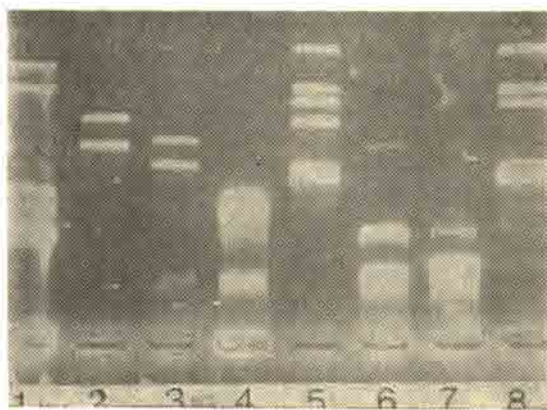
Результаты и обсуждение. Размер плазмиды рAVK3 составляет 8,1 тысячи пар оснований (тпо). Эта плазмида содержит EcoRI-фрагмент величиной 3,4 тпо, в котором находятся некоторые гены биосинтеза аргинина, в том числе ген *arg E*, кодирующий синтез ацетилорнитин-деацетилазы. Плазмида рAVK3 придает клеткам *E. coli* устойчивость к ампициллину.

Плазмидный вектор рGK8 размером около 12 тпо имеет два нопалинсинтазных промотора, один из которых в растительных и бактериальных клетках определяет транскрипцию бактериального гена неоминифосфотрансферазы типа II (NPT II), выделенного из транспозона Tn5. Ген NPT II кодирует устойчивость к канамицину путем фосфорилирования этого антибиотика и благодаря этому широко используется как удобный маркер для отбора трансформантов как у бактериальных, так и растительных клеток [11]. Сразу вслед за вторым нопалинсинтазным промотором находится уникальный сайт рестрикции EcoRI, пригодный для клонирования генов. Вектор рGK8 также придает бактериальным клеткам устойчивость к ампициллину.

Переклонирование бактериальных генов биосинтеза аргинина из плазмиды рAVK3 на вектор рGK8 осуществляли следующим образом. ДНК плазмид рAVK3 и рGK8 обрабатывали в отдельности эндонуклеазой рестрикции EcoRI. Этот фермент образует выступающие 5'-концы, каждый из которых может взаимодействовать с любым другим, комплементарным ему концом [7]. Расщепленные рестриктазой ДНК рAVK3 и рGK8 смешивали в соотношении 1:3 в объеме 20 мкл (конечная концентрация ДНК 150 мкг/мл) и сшивали с помощью

ДНК-лигазы (1 ед.) в течение 10 ч при 12°C. В процессе лигирования происходит соединение *EcoRI*-фрагментов ДНК [7].

Лигированной смесью трансформировали клетки реципиентного штамма *E. coli* K-12 XSID2 *gcsA*, ауксотрофного по аргинину (делеция в гене *argE*) и дефектного по гену *gcsA* (для предотвращения рекомбинации между гомологичными участками ДНК в плазмиде и хромосоме). Трансформанты отбирали на селективной среде без аргинина по приобретению клетками признака прототрофности. Прототрофные по аргинину колонии проверяли на присутствие признака устойчивости к следующим антибиотикам: канамицину (15 мкг/мл), тетрациклину (50 мкг/мл), налидиксовой кислоте (30 мкг/мл), рифампицину (25 мкг/мл). Среди 50 прототрофных по аргинину колоний через двое суток выросло 20 трансформантов, устойчивых к указанным антибиотикам. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и подвергали рестрикционному анализу. Электрофоретический анализ указал на присутствие в них наряду с векторной ДНК дополнительных фрагментов. У пяти рекомбинантных плазмид приобретенный *EcoRI*-фрагмент соответствовал ожидаемому размеру. Электрофореграмма рестриктвов одной из рекомбинантных плазмид, обозначенной как *pGK8-arg3*, представлена на рисунке. Как видно, эта плаزمида состоит из полного вектора *pGK8* размером 12 тпо и дополнительного *Eco*



Электрофореграмма нативных и рестрицированных плазмидных ДНК: 1. Маркер λ -Hind III; 2. *pAVK3/EcoRI* и *PstI*; 3. *pAVK3/EcoRI*; 4. *pAVK3* нативная; 5. *pGK8-arg3/EcoRI* и *PstI*; 6. *pGK8-arg3/EcoRI*; 7. *pGK8-arg3* нативная; 8. *pGK8/EcoRI* и *PstI*.

RI-фрагмента размером 3,4 тпо. Плазмида при перетрансформации в штамм *E. coli* K-12 XSID2 *gcsA* придавала ему с одинаково высокой частотой ($1-5 \times 10^5$ трансформантов на 1 мкг ДНК) как устойчивость к канамицину и ампициллину, так и прототрофность по аргинину.

Представленные данные однозначно свидетельствуют о том, что в составе рекомбинантной плазмиды *pGK8-arg3* присутствуют некоторые бактериальные гены биосинтеза аргинина, включая ген *arg E*. Вопрос о функционировании бактериального гена *argE* под контролем собственного промотора или нопалинсинтазного остается пока открытым.

Нам представляется, что сконструированная плазмида *pGK8-arg3* является удобной моделью для изучения особенностей экспрессии генов биосинтеза аргинина в растительных клетках.

Работа выполнена на базе лаборатории генной инженерии НИТИА, сотрудников которой благодарим за оказанное содействие.

Катедра физиологии и анатомии растений

Поступила 5.05.1988

ЛИТЕРАТУРА

1. Пирюзян Э. С., Андрианов В. М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М.: Наука, 1985.
2. Herrera-Estrella L., Depicker A. Van Montagu M., Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector.—Nature, 1983, v. 303, p. 209—215.
3. Robert T. Fraley, Stephen G. Rogers, Robert B. Horch and et. al. Expression of bacterial genes in plant cells.—Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Genetics, 1983, v. 80, pp. 4803—4807.
4. Marc De Block, Luis Herrera-Estrella, Marc Van Montagu and et. al. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny.— The EMBO Journal, 1984, v. 3, № 8 pp. 1681—1689.
5. Vaeck M., Van Montagu, Reynaerts A. and et al. Transgenic plants protected from insect attack.— Nature, 1987 v. 328, № 6125, pp. 33—37.
6. Генетика и наследственность. Сб. статей. Г 34. Пер. с франц. М.: Мир, 1987.
7. Т. Маннатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
8. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkalain extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.— Nucleic Acids Res., 1979, v. 7, p. 1513.
9. Mandel M., Higa A. Calcium deendent bacteriophage DNA infection.— J. Mol. Biol., 1970, v. 53, p. 154.
10. Dagerl M., Ehrlich S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells.—Gene, 1979, v. 6, p. 23.
11. Edward C. Cocking and Michael R. Davey. Gene transfer in cereals.— Sciens, 1987, v. 236, pp. 1259—1262.

Ա մ փ ո փ ու մ

Իրականացված է *Bacillus stearothermophilus*-ի արգինինի կենսասինթեզի որոշ գենների՝ այդ թվում *argE* գենի կլոնավորումը *pGK8* վեկտորի վրա, որն ընդունակ է կատարել բուսական պրոտոպլաստների տրանսֆորմացիա: Ատեղծված *pGK8-argE* նոր ռեկոմբինանտ պլազմիդը կարող է օգտագործվել բույսերի բջիջների մեջ բակտերիալ գենների էքսպրեսիայի ուսումնասիրման համար:

S u m m a r y

The cloning of some genes of arginine biosynthesis and among them *argE* gene of thermophil bacteria *Bacillus stearothermophilus* on the *pGK8* vehicle, that can transform plant protoplasts has been realized. The constructed new recombinant plasmide can be used for the investigation of the peculiarities of expression of bacterial genes in plant cells.