

с увеличением новосинтезированных мРНК или это обусловлено активацией процесса инициации биосинтеза белка на предшествующих матрицах, пока еще не выяснено.

Таким образом, экспериментально установлено повышение полипептидного синтеза на эндогенных матрицах в бесклеточной системе, выделенной из зародышей высокогетерозисных гибридных растений. При добавлении экзогенной матрицы процент стимуляции синтеза у родительских форм таких гибридов значительно выше, чем в поколении  $F_1$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Активность рибосом проростков гибридных и инбредных форм кукурузы в бесклеточной системе синтеза белка* / Л. Т. Оплачко, С. С. Костышин, Л. А. Яковлева, М. М. Марченко // Физиология растений.— 1985.—32, № 4.— С. 710—714.
2. *Еркеев М. И., Кудоярова Г. Р.* Изучение активности белоксинтезирующей системы у гетерозисных гибридов кукурузы // Там же.— 1981.—28, № 4.— С. 880—883.
3. *Конярев В. Г.* Биохимия и молекулярная генетика гетерозиса // Гетерозис.— Минск : Наука и техника, 1982.— С. 163—178.
4. *Yamada M., Ishige T., Ohkawa Y.* Reappraisal of Ashby's hypothesis on heterosis of physiological traits in maize, *Zea mays* L. // Euphytica.— 1985.—34, N 3.— P. 593—598.
5. *Yamada M.* Heterosis in embryo of maize, *Zea mays* L. // Bull. Nat. Inst. Agrobiol. Res.— 1985.— N 1.— P. 85—98.
6. *Roberts B. E., Patterson B. M.* Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.—70, N 5.— P. 2330—2334.
7. *Marcus A., Efron D., Weeks D. P.* The wheat embryo cell-free system // Meth. Enzymol.— 1974.—30.— P. 749—761.
8. *Mans R. J., Novelli G. D.* Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method // Arch. Biochem. and Biophys.— 1961.—94.— P. 48—53.
9. *Синтез РНК и белка в ранний период прорастания зародышей кукурузы в связи с гетерозисом* / С. С. Костышин, Л. Н. Хлус, Л. Т. Оплачко, М. М. Марченко // С.-х. биология.— 1988.— № 1.— С. 35—38.

Черновин. гос. ун-т

Получено 15.03.88

#### PECULIARITIES OF PROTEIN SYNTHESIS ON ENDOGENOUS mRNAs IN CELL-FREE SYSTEMS FROM GERMS OF THE DIFFERENT MAIZE FORMS

*M. M. Marchenko, L. T. Oplachko, S. S. Kostyshin, L. S. Yazlovitskaya*  
University, Chernovtsy

#### Summary

The activity of polypeptide synthesis on the endogenous mRNAs and poly(U) in the cell-free system from germs of the different maize forms is studied. Translational activity on the endogenous mRNAs in the cell-free system isolated from the hybrid maize germs is established to increase. The polypeptide synthesis stimulation by poly(U) in parental forms of super heterosis hybrids is higher than in generation  $F_1$ .

УДК 577.2.08

**Е. Б. Патон, А. Г. Терентьев**

#### ПРЕИМУЩЕСТВА Z-gal ПРИ СЕЛЕКЦИИ РЕКОМБИНАНТОВ ПО Lac-ФЕНОТИПУ

*Рассмотрены преимущества использования Z-gal в качестве хромогенного субстрата β-галактозидазы при селекции рекомбинантов по Lac-фенотипу.*

Lac<sup>+</sup>-фенотип, обеспечиваемый экспрессией гена *lacZ*, является одним из маркеров, наиболее часто используемых в практике конструирования

рекомбинантных ДНК. Селекция по этому признаку проводится при использовании в качестве векторных средств широкого круга плазмид, фагов и их гибридов — фазмид [1—4]. Часто она основывается на утере рекомбинантами *Lac*<sup>+</sup>-фенотипа вследствие встраивания чужеродной ДНК в структурную последовательность гена *lacZ*, нарушающую ее рамку считывания. Для визуализации *Lac*<sup>+</sup>-фенотипа среда для отбора рекомбинантов обычно включает хромогенный субстрат β-галактозидазы X-gal (5-бром, 4-хлор, 3-индолил, β-D-галактопиранозид), обуславливающий голубую окраску *Lac*<sup>+</sup>-колоний. На практике мы столкнулись с необходимостью в целом ряде случаев вести отбор рекомбинантов на основании восстановления активности β-галактозидазы при восполнении структурной и/или регуляторной областей гена *lacZ*. Применяя X- и Z-gal (5-бром, 3-индолил, β-D-галактопиранозид), мы заметили, что последний обеспечивает более интенсивную синюю окраску *Lac*<sup>+</sup>-клонов. В определенных случаях, когда при первичном скрининге рекомбинантов желательнее оценить уровень экспрессии гена *lacZ*, варибельность и большая интенсивность окраски является преимуществом, облегчающей селекцию. В частности, при конструировании рекомбинантной плазмиды на основе *pUC18*, в которой промотор *lac* удален или репрессирован, необходимо было выбрать ориентацию встраиваемого фрагмента ДНК, обеспечивающую транскрипцию образовавшегося гена *rplL'-lacZ'* лишь с очень слабого по сравнению с *P<sub>lac</sub>* промотора *P<sub>L12</sub>* [5]. Уровень активности β-галактозидазы в данном случае был меньше 1 ед. Миллера, что в 100—200 раз ниже такового в случае транскрипции с *P<sub>lac</sub>*. Успешный отбор рекомбинантов, таким образом, прямо соотносился с интенсивностью обеспечиваемого Z-gal *Lac*<sup>+</sup>-фенотипа. Мы убедились в преимуществах Z-gal и при работе с плазмидой *pNM481* [6]. В данном случае возможность оценки уровня экспрессии гибридных генов *lacZ*, коррелирующая с интенсивностью синей окраски клонов, обеспечила удобство первичного скрининга рекомбинантных плазмид, когда ген *lacZ* становился чувствительным к сигналам инициации транскрипции и трансляции разной эффективности [7]. В сконструированных рекомбинантных плаزمидах *pIK5*, содержащей ген *rplL'-lacZ'*, и *pIK7* с геном *rplL'-lacZ'* транскрипция гибридных генов обеспечивалась весьма слабым промотором *P<sub>4</sub>* векторной плазмиды [7]. В задачу исследования входило сравнение уровня экспрессии этих генов, обеспечиваемого данным промотором и промоторами с другой силой, но идентичными для обоих генов. Селекцию рекомбинантных плазмид после лигирования *pIK5* и *pIK7* с фрагментами ДНК, содержащими промоторы *P<sub>B</sub>* и *P<sub>L11</sub>*, значительно облегчила возможность визуальной предварительной оценки уровня экспрессии гена *lacZ*. Преимуществом возможности первичного скрининга рекомбинантов по интенсивности обеспечиваемой Z-gal синей окраски может быть случай клонирования чужеродной ДНК методом «shotgun», в результате чего функциональная активность гена *lacZ* может быть восстановлена при слиянии его с разными фрагментами, отличающимися, однако, по эффективности обеспечиваемого уровня экспрессии β-галактозидазы.

Суммируя все вышеизложенное, можно заключить, что применение Z-gal, обеспечивающего более интенсивную окраску *Lac*<sup>+</sup>-колоний *E. coli*, позволяет в целом ряде случаев осуществить простой и достоверный первичный скрининг рекомбинантов по этому признаку.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yunish-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.
2. Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Ibid.— 1982.—19, N 2.— P. 259—268.
3. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (F1) as vectors for recombinant DNA — a review // Ibid.— N 1.— P. 1—10.

4. Dente L., Cesareni G., Cortese R. *pEMBL*: a new family of single stranded plasmids // Nucl. Acids Res.—1982.—11, N 6.— P. 1645—1655.
5. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Однонаправленная ориентация при клонировании фрагментов *rplKAIL*-генов *Escherichia coli* в многокопийной плазмиде *pUC* // Биополимеры и клетка.— 1989.—5, № 1.— С. 58—66.
6. Minton N. Improved plasmid vectors for isolation of translation lac gene fusions // Gene.— 1984.—31, N 2.— P. 269—273.
7. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Изучение регуляции экспрессии гена *rplL Escherichia coli* методом слияния с геном *lacZ* в плазмиде *pNM481* // Биополимеры и клетка.— 1989.—5, № 2.— С. 99—102.

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

Получено 19.01.89

#### ADVANTAGES OF Z-GAL DURING SELECTION OF RECOMBINANTS ON LAC PHENOTYPE

*E. B. Paton, A. G. Terentyev*

#### Summary

Advantages of Z-gal use as a chromogenic substrate of  $\beta$ -galactosidase, when selecting recombinants by Lac phenotype, are discussed.