

6. *Androgenesis and haploid plants*. – Berlin, Heidelberg, New York. – 1998. – 297p.
7. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа – 2002. – 22с.
8. Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений – Уфа. – 2008. – 122с.
9. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. раст. – 1986. – Т. 33, № 6. – С.1221-1227.
10. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н. Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов // Физиол. Раст. – 1989. – Т. 37, № 1. – С. 80-89.
11. Веселов С.Ю., Вальке Р.С., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака // Физиол. Раст. – 1999. – Т. 46, № 1. – С.34-40.
12. Камелина О.П., Проскура О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 1992. – Т. 77, № 4. – С.93-96.
13. Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. – 1999. – № 3. – С.275-281.
14. Куперман Ф.М. Морфофизиология растений. – М. – 1977. – 256 с.
15. Chuang Ch.-Ch., Ouyang T.-W. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Sympos. Plant Tissue Culture. – Peking – 1978. – P.51-56.
16. Blaydes D.F. Interaction of kinetin and varioris inhibitors in the growth of soybean // Physiol. Plant. – 1966. – V. 19, № 13. – P.748-753.

Резюме

Приводятся и анализируются основные этапы биотехнологии андроклиной гаплоидии у яровой мягкой пшеницы. Биотехнология оптимизирована на основе использования комплексных цитоэмбриологических и физиологических исследований.

The main stages of biotechnology of androclinic haploidy of spring soft wheat are resulted and analyzed. The biotechnology is optimized on the basis of employment of complex cytoembryological and physiological investigations.

КУЦЯБА В.І., ПИНЯГА Ю.В., БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р., ГОНЧАР М.В., ФЕДОРОВИЧ Д.В., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України

Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова 14/16, e-mail: vasylkutsiaba@yahoo.com

РОЗРОБКА СИСТЕМИ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РЕГУЛЯТОРНИХ ГЕНІВ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ У ДРІЖДЖІВ *PICHA GUILLIERMONDII*

Клонування регуляторних генів біосинтезу рибофлавіну (РФ) флавіногенних дріжджів *Pichia guilliermondii* є важливим етапом при дослідженні молекулярних механізмів регуляції цього процесу, а також є основою для робіт у галузі метаболічної інженерії – конструюванні надсинтетиків РФ нового покоління. Відома нуклеотидна послідовність геному цих дріжджів не завжди дозволяє клонувати регуляторні гени біосинтезу РФ за допомогою методу інсерційного мутагенезу, тому залишається актуальною розробка ефективних систем для клонування таких генів методом функціональної комплементациї.

У 1991 році у дріжджів *P. guilliermondii* було описано мутацію *rib1-86* (C207Y) [1], яка майже повністю інактивує перший фермент флавіногенезу – ГТФ-циклогідролазу II, викликаючи у дріжджів ауксотрофність за РФ у середовищі з оптимальним для росту вмістом заліза, але не у залізодефіцитному середовищі, коли відбувається дерепресія синтезу цього фермента. Вірогідно, виділений мутант *rib1-86* є брадітрофним (leaky) мутантом по гену *RIB1*. Мутація *rib81-131* у регуляторному гені біосинтезу РФ негативного типу дії, подібно до залізодефіцитних умов вирощування дріжджів, викликає дерепресію синтезу ГТФ-циклогідролази II внаслідок посиленої експресії гена *RIB1*, що було показано за допомогою Нозерн блот-гібридизації [2], тому подвійні мутанти *rib1-86 rib81* є прототрофами за РФ.

Мутація *rib83-6*, яка пошкоджує неідентифікований регуляторний ген позитивного типу дії, епістатує над мутацією *rib81-131* [3], тому сконструйований потрійний мутант генотипу *rib1-86 rib81 rib83* виявився ауксотрофом за РФ [4]. Таким чином, мутація *rib83-6* повністю виключає дію мутації *rib81-131*, тому введення гена *RIB83* у складі плазмід у клітини такого потрійного мутанта буде приводити до відновлення дії мутації *rib81-131* і, як наслідок, до появи прототрофних за РФ клонів. Таким чином, потрійний мутант як реципієнт міг би стати основою системи для клонування регуляторного гена *RIB83* з бібліотеки генів *P. guilliermondii* шляхом позитивної селекції прототрофних за РФ трансформантів.

Матеріали і методи

У роботі було використано такі штами дріжджів *P. guilliermondii*: ATCC 9058 – дикий тип, мутанти з пошкодженою регуляцією біосинтезу РФ 18-Д78/2 *hisX rib81* MAT⁻, 3-Д93/8 *argX rib81* MAT⁺, 32-Д93/8 *argX rib81* MAT⁻, 2-Д82/1 *lysX rib83* MAT⁺; LV160 *rib1-86* MAT⁺ - РФ-залежний мутант. Бактерійний штам *E. coli* DH5α *lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169*) використовувався для селекції та ампліфікації плазмід.

Склад середовищ і умови вирощування дріжджів, методи генетичного аналізу описані у [5,6]. Біомасу дріжджів визначали на фотоелектроколориметрі ФЕК-56М. Концентрацію флавінів – флуорометрично на приладі ЕФ-3М. Усі генно-інженерні маніпуляції проводили відповідно до [7].

Результати та обговорення

Першим етапом цієї роботи було конструювання стабільного штама-реципієнта генотипу *rib1-86 rib81 rib83*, який міг би зберігати фенотип *Rib⁻* протягом 10 - 12 днів. Такий час є достатнім для відбору трансформантів на селективному середовищі і виділення з них реплікативних плазмід. Для того, щоб сумістити мутації *rib1-86* і *rib81-131* в одному гаплоїдному геномі, схрестили мутант 18-Д78/2 *hisX rib81* MAT⁻ з штамом LV160 *rib1-86* MAT⁺. У отриманого диплоїда Д93/13 індукували мейоз, виділили мейотичні сегреганти і у прототрофних за РФ і нездатних до його надсинтезу представників перевіряли наявність мутації *rib81-131*. Для цього їх схрестили з мутантами 3-Д93/8 *argX rib81-131* MAT⁺ і 32-Д93/8 *argX rib81-131* MAT⁻ і у отриманих диплоїдів досліджували флавіногенез. Надсинтез РФ у диплоїдів свідчив про наявність у сегрегантів мутації *rib81-131*, а також генотипу *rib1-86 rib81*. Було виділено колекцію таких сегрегантів. Сегрегант 29-Д93/13, який нагромаджував велику біомасу і не втратив здатності до схрещування, був використаний для конструювання потрійного мутанта. Після схрещування його з штамом 2-Д82/1 *lysX rib83-6* MAT⁺ з отриманого диплоїда Д93/73 виділили ауксотрофні за РФ мейотичні сегреганти і схрестили їх з мутантами *rib81* і *rib83*. Висока флавіногенна активність першого диплоїда у середовищі з оптимальним для росту вмістом заліза і відсутність надсинтезу РФ у залізодефіцитному середовищі другого диплоїда свідчила про наявність у досліджуваного сегреганта генотипу *rib1-86 rib81 rib83*.

Сегреганти генотипу *rib1-86 rib81 rib83* були нестабільними і легко ревертували до фенотипу *Rib⁺*. На поверхні штрихів сегрегантів на агаризованому YPD через 10 –

14 днів зберігання виростала велика кількість „бородавок” - прототрофних за РФ клонів, але деякі з сегрегантів були значно стабільнішими. На поверхні їх штрихів виростало лише 2 – 3 „бородавки”. Один з таких сегрегантів (12-Д93/73), який також ріс на середовищі YPD з РФ краще, ніж інші сегреганти, було відібрано як реципієнт для клонування гена *RIB83*. Висівання на чашки з YPD $2 \cdot 10^7$ клітин (як при стандартній методиці клонування) не приводило до появи підросту і спонтанних ревертантів через 10 днів інкубації при 30 °С.

Ефективність трансформації реципієнта досліджували за допомогою плазмиди p19R1, яка містить ген *RIB1 P. guilliermondii*. Трансформацію реципієнта проводили методом електропорації. Ефективність цього методу була вищою, ніж у випадку використання хлористого літію. Підібрано такі оптимальні параметри електротрансформації: кювета 1 мм, 40 мкл суспензії клітин реципієнта 100 од. опт. густ. з 0,5 – 2 мкг плазмідної ДНК, опір – 200 Ом, ємність – 25 мкФ, напруга – 1,8 кВ. Після трансформації клітини висівали на агаризоване середовище YPD без РФ, яке містило 0,3 М сахарозу. При дотриманні цих параметрів частота трансформації реципієнта становила до 10^4 трансф./мкг плазмідної ДНК. Ефективність трансформації зростала майже у 2 рази після обробки клітин Li-ацетатом на початкових етапах приготування компетентних клітин. Після трансформації реципієнта ревертанти на контрольних чашках з’являлися лише через 10 днів.

Наступним етапом роботи стало створення геномної бібліотеки штама *P. guilliermondii* ATCC 9058 на основі бірепліконного (*P. guilliermondii*/*E. coli*) вектора pUC-ARS, який є похідним від pUC19. Бактерійна частина вектора pUC-ARS містить ген резистентності до ампіциліну, що кодує фермент β -лактамазу, реплікатор *E. coli* (*ori*), а дріжджова частина представлена ARS-елементом *P. guilliermondii* у складі *HincII* фрагмента розміром 0,82 т.п.н., який забезпечує реплікацію вектора у дріжджах. Хромосомну ДНК *P. guilliermondii* ATCC 9058 гідролізували за допомогою рестриктази *EcoRI*. Отримані фрагменти ДНК лігували в *EcoRI* сайт вектора.

В результаті електротрансформації штама *E. coli* DH5 α таким лігатом було отримано понад 10^4 колоній ампіцилін-резистентних трансформантів. Ці колонії були змиті стерильним середовищем LB, що містило ампіцилін. Отриману суспензію підрошували і виділяли плазмідну ДНК. Таким чином було отримано геномну бібліотеку штама *P. guilliermondii* ATCC 9058.

За допомогою методу електропорації даною бібліотекою генів трансформували реципієнтний штам *P. guilliermondii* генотипу *rib1-86 rib81 rib83*. Було отримано 28 колоній прототрофних за РФ дріжджових трансформантів. З однієї з них виділили плазмиду (pN1), яка з невисокою ефективністю (10 трансф./мкг ДНК) трансформувала реципієнт до прототрофності за РФ. Плазміда містила фрагмент ДНК *P. guilliermondii*, про що свідчила менша електрофоретична рухливість її порівняно з вихідним вектором pUC-ARS (рис.1А). Було проведено рестрикційний аналіз плазмід pUC-ARS і pN1 за допомогою ендонуклеаз рестрикції *EcoRI* і *HincII* (рис.1А). Рестрикційний аналіз плазмиди pN1 за допомогою рестриктази *EcoRI* показав, що вона розщеплюється на два фрагменти: вихідний вектор pUC-ARS (3,5 т.п.н.) і фрагмент хромосомної ДНК *P. guilliermondii*, що несе, вірогідно, ген *RIB83* або його супресор (1,7 т.п.н.). Рестрикційний аналіз плазмиди pN1 за допомогою рестриктази *HincII* підтвердив, що вона, як і вихідний вектор, містить ARS елемент *P. guilliermondii* (фрагмент ДНК 0,82 т.п.н.) і два додаткові *HincII* сайти, що знаходяться в клонованому фрагменті ДНК. На основі цих результатів запропоновано схему плазмиди pN1 (рис. 1Б).

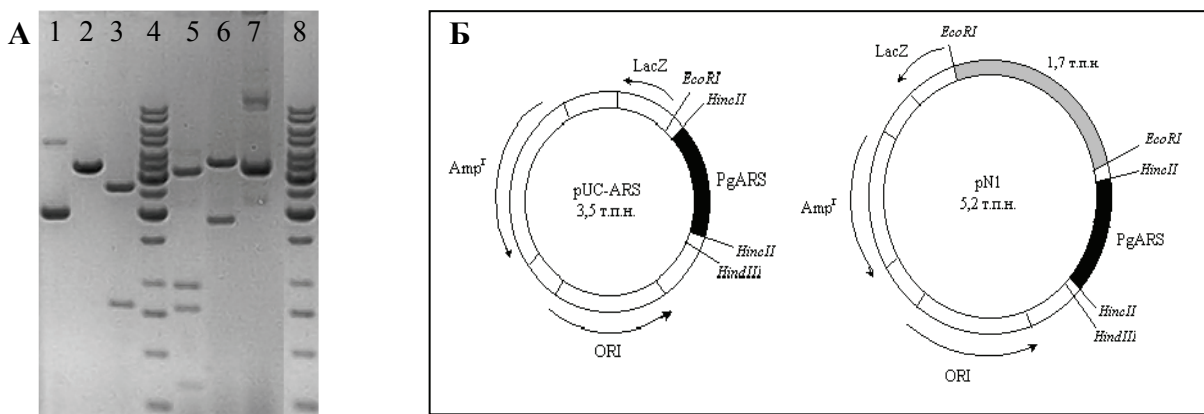


Рис. 1. А - Электрофореграма плазмід рUC-ARS (3,5 т.п.н.) і рN1 (5,2 т.п.н.) та їх рестрикційних фрагментів.

1 – нативна форма плазміди рUC-ARS; 2 – плазміда рUC-ARS, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*; 3 – плазміда рUC-ARS, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *HincII*; 4 і 8 – маркери молекулярної маси (GeneRuler™ 1 kb Ladder); 5 – плазміда рN1, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *HincII*; 6 – плазміда рN1, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*; 7 - нативна форма плазміди рN1.)

Б - схема плазмід рUC-ARS і рN1 (фрагмент ДНК *P. guilliermondii*, що несе *PgARS*, позначено товстою чорною лінією; послідовність рUC19 – товстою білою лінією; клонований фрагмент ДНК *P. guilliermondii* – товстою сірою лінією.)

Аналіз нуклеотидної послідовності клонованого фрагмента ДНК показав, що він містить дві неповні відкриті рамки трансляції генів *HEM12* і амінопептидази X з невідомою функцією. Повні гени *HEM12* та амінопептидази X були клоновані у складі реплікативних векторів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, використовуючи відповідні праймери. Була проведена трансформація реципієнта даними плазмідами. Трансформанти були отримані лише у випадку плазмід із геном *HEM12* з такою ж частотою, як у випадку трансформації реципієнта плазмідною рN1. Вірогідно, клонований фрагмент гена *HEM12* і повний ген *HEM12* викликають зростання частоти інтеграції рекомбінантних плазмід у певні локуси геному реципієнта, що призводить до появи прототрофних за РФ інсерційних мутантів внаслідок супресії дії мутації *rib83-6*.

Висновки

1. Сконструйовано стабільний штам-реципієнт генотипу *rib83 rib1-86 rib81*, придатний для клонування регуляторного гена біосинтезу РФ *RIB83*.

2. Підібрано оптимальні умови для трансформації реципієнта банком генів дріжджів *P. guilliermondii* методом електропорації.

3. З банку генів дріжджів *P. guilliermondii* виділено плазмиду, яка з частотою 10 трансф./мкг ДНК трансформує штам-реципієнт до прототрофності за РФ.

4. Аналіз нуклеотидної послідовності клонованого фрагмента виявив неповну рамку трансляції гена *HEM12*. Трансформація реципієнта плазмідною із клонованим нативним геном *HEM12* не привела до зростання частоти появи прототрофних трансформантів.

Література

1. Шавловский Г.М., Стенчук Н.Н., Кшановская Б.В. Влияние регуляторной мутации в локусе *RIB1* на биосинтез рибофлавина у *Pichia guilliermondii*. // Биополимеры и клетка. – 1991. – 7. – С. 96-99.

2. Boretsky Y.R., Kapustyak K.E., Fayura L.R., Stasyk O.V., Stenchuk M.M., Bobak Y.P., Drobot L.B., Sybirny A.A. Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. // FEMS Yeast Research. -2005. – 5. – P. 829-837.
3. Шавловський Г.М., Колтун Л.В., Кушановська Б.В., Логвиненко Е.М., Стенчук Н.Н. Регуляція біосинтезу рибофлавіна елементами позитивного контролю у дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика. - 1989. - Т.25, №2. - С. 250-258.
4. Стенчук М.М., Кушановська Б.В., Куцяба В.І., Шавловський Г.М. Особливості біосинтезу рибофлавіну у мутантів *Pichia guilliermondii* з пошкодженими генами позитивного і негативного типу регуляції флавіногенезу. // Тези доп. VI Українського біохімічного з'їзду. - Київ. - 1992. - Ч.1. - С. 52.
5. Шавловський Г.М., Жарова В.П., Щелокова И.Ф., Трач В.М., Сибірний А.А., Кушановська Б.В. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii*. // Прикл. биохимия и микробиология. -1978. – т. 14., вып.2. – с. 184-189.
6. Сибірний А.А., Шавловський Г.М., Кушановська Б.В., Наумов Г.И. Гибридизация и мейотическое расщепление у парафинусваивающих дрожжей *Pichia guilliermondii* Wickerham // Генетика. – 1977. - Т.13, №2. – С. 314-321.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М., Мир. – 1984. - 480 с.

Резюме

Розроблено систему генетичної трансформації для ідентифікації регуляторних генів біосинтезу рибофлавіну у *P. guilliermondii*. Вірогідно, клонований фрагмент гена *HEM12* викликає зростання частоти інтеграції рекомбінантних плазмід у певні локуси геному реципієнта, що призводить до появи прототрофних за рибофлавіном інсерційних мутантів внаслідок супресії дії мутації *rib83-6*.

Разработана система генетической трансформации для идентификации регуляторных генов биосинтеза рибофлавина у *P. guilliermondii*. Вероятно, клонированный фрагмент гена *HEM12* повышает частоту интеграции рекомбинантных плазмид в определённые локусы генома реципиента, что вызывает возникновение прототрофных по рибофлавинову инсерционных мутантов вследствие супрессии действия мутации *rib83-6*.

Transformation system for cloning of regulatory genes of riboflavin biosynthesis was designed. Probably, the cloned DNA fragment which contains the part of *P.guilliermondii* gene *HEM12* integrates into some loci of the recipient strain genome. It leads to riboflavin prototrophy of the insertional mutants as a result of suppression of the *rib 83-6* mutation.

ЛУК'ЯНЧУК В.В.

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
Україна, Д03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 154, e-mail: vitaly@serv.imv.kiev.ua*

КЛОНУВАННЯ ПЛР-АМПЛІКОНА ХРОМОСОМИ *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) - це один з найсучасніших методів прямого аналізу нуклеотидної послідовності ДНК. Цей метод дозволяє накопичувати в значній кількості копії виключно бажаних фрагментів досліджуваної ДНК. Метод ПЛР дозволяє визначати первинну будову ДНК незалежно від її джерела, розміру молекули чи галузі призначення досліджень. Метод також є абсолютно специфічним: має місце ампліфікації тільки чітко визначеної послідовності ДНК