

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Plasmid Col E<sub>1</sub>* as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA / V. Hersfield, H. W. Boyer, C. Yanovsky, M. A. Lovett // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1974.— 71, N 9.— P. 3455—3459.
2. *Overexpression, solubilization and refolding of a genetically engineering derivative of the penicillinbinding protein 3 of E. coli K 12* / G. B. de Belder, M. N. Disteché, H. N. Houba et al. // *Mol. Microbiol.*— 1988.— 2, N 4.— P. 519—525.
3. *Localization of inclusion bodies in E. coli overproducing  $\beta$ -lactamase or alkaline phosphatase* / G. Georgion, J. N. Telford, M. L. Shuler, D. B. Wilson // *Appl. Envir. Microbiol.*— 1986.— 52, N 5.— P. 1157—1161.
4. Moir A., Brammer W. J. The use of specialised transducing phages in the amplification of enzyme production // *Mol. and Gen. Genet.*— 1976.— 149, N 1.— P. 87—99.
5. *Плазмиды. Методы* / Под ред. К. Харди.— М.: Мир, 1989.— 267 с.
6. Dageri M., Ehrlich S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells // *Gene.*— 1979.— 6, N 1.— P. 23—28.
7. Сорошинская Т. В., Черных С. И. Исследование синтеза  $\beta$ -лактамазы TEM 1 в различных штаммах *E. coli* при заражении их фагом  $\lambda$ b1a с амбер-мутациями в регуляторных генах // *Биополимеры и клетка.*— 1991.— 7, № 1.— С. 101—107.
8. Чайковская С. М., Венкина Т. Г. Модифицированный иодометрический метод определения активности  $\beta$ -лактамазы // *Антибиотики.*— 1962.— 7, № 5.— С. 453—456.
9. Гуревич А. И., Бабий Н. И. Роль структурных элементов плазмид группы *Col E<sub>1</sub>* в контроле репликации // *Биоорг. химия.*— 1987.— 13, № 2.— С. 213—218.

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

Получено 27.07.90

УДК 579.254

О. Н. Добачевская, С. Е. Рымарь, В. А. Кордюм

### ВЛИЯНИЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА ПЕРЕНОС ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В Ti-ПЛАЗМИДУ AGROBACTERIUM TUMEFACIENS, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЙ С ПОМОЩЬЮ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ВЕКТОРОВ

*Изучали влияние УФ-облучения реципиентных клеток *A. tumefaciens* на частоту переноса чужеродных генов в Ti-плазмиду, осуществляемого с помощью промежуточных векторов. Показано, что эффективность переноса возрастает в 10—100 раз после кратковременного облучения реципиентных клеток. УФ-облучение клеток *A. tumefaciens* перед конъюгацией предлагается в качестве приема для повышения эффективности переноса чужеродных генов в Ti-плазмиду *A. tumefaciens* при использовании для этого промежуточных векторов.*

**Введение.** Один из наиболее распространенных способов переноса чужеродных генов в растительный геном заключается в трансформации растительных клеток Ti-плазмидой *A. tumefaciens*. Чужеродные гены либо вводятся в Ti-плазмиду с помощью промежуточных векторов [1] и в составе T-ДНК сопереносятся в растительный геном, либо такой соперенос осуществляется бинарной системой [2]. При использовании промежуточных векторов перенос чужеродного гена в Ti-плазмиду происходит за счет рекомбинации *in vivo* между гомологичными участками промежуточного вектора и Ti-плазмиды. Частота появления трансконъюгантов, содержащих коинтеграцию Ti-плазмиды — промежуточный вектор, отражает эффективность двух процессов: переноса плазмиды в реципиентную клетку и рекомбинации и также зависит от протяженности области гомологии [3]. Эта величина, как правило, невелика ( $10^{-8}$ — $10^{-7}$  на реципиентную клетку) и в некоторых случаях получить трансконъюганты без определенных усилий не удается.

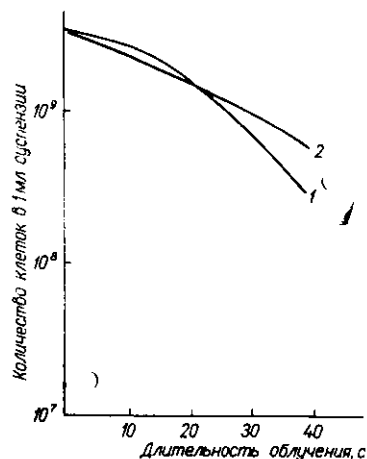
В данной работе описано применение УФ-облучения реципиентных клеток агробактерий для повышения частоты переноса чужеродных генов в Ti-плазмиду, происходящего в результате рекомбинации между Ti-плазмидой и плазмидой, в которой локализован чужеродный ген, т. е. промежуточным вектором.

© О. Н. ДОБАЧЕВСКАЯ, С. Е. РЫМАРЬ, В. А. КОРДЮМ, 1991

**Материалы и методы.** В работе использовали следующие бактериальные штаммы: *Escherichia coli* GJ23, содержащий плазмиды GJ28 и R64drd11, *E. coli* HB101, *A. tumefaciens* C58 и GV3850 — (*nal<sup>r</sup>*). Промежуточными векторами служили плазмиды *pBR322-4T* и *pLGV23neo*. Первая сконструирована нами следующим образом: в *Pst*I-сайт *pBR322* (с инактивированным *Bam*HI-сайтом) был клонирован IV *Pst*I-фрагмент *pTiC58*, затем в *Bam*HI-сайт этого фрагмента встроены *Eco*RI-*Sal*I-фрагмент *pKC7*, содержащий ген *neo*. Выделение ДНК, клонирование, рестрикционный анализ, трансформацию *E. coli* проводили по общепринятым методикам [4]. Конъюгацию

Влияние УФ-облучения на жизнеспособность клеток *A. tumefaciens*: 1 — штамм C58; 2 — штамм GV3850

The influence of the UV irradiation on the survival of the *A. tumefaciens* cells: 1 — C58 strain, 2 — GV3850 strain



осуществляли по [3]. Клетки агробактерий облучали, помещая в чашки Петри (8 см) 2,5 мл клеточной суспензии, двумя лампами БУФ 30 на расстоянии 35 см. Отбор трансконъюгантов, содержащих коинтеграты *Ti*-плазмиды — промежуточный вектор, осуществляли на среде УЕВ (100 мкг/мл налидиксовой кислоты и 30 мкг/мл сульфата каминацина).

**Результаты и обсуждение.** В экспериментах по изучению влияния УФ-облучения на частоту появления трансконъюгантов, содержащих коинтеграты *Ti*-плазмиды и промежуточного вектора, в качестве реципиентов использовали два штамма *A. tumefaciens*: C58 и GV3850. Штамм C58 содержит нопалиновую *Ti*-плазмиду, а штамм GV3850 является производным C58, в *Ti*-плазмиде которого делетирована вся Т-ДНК, за исключением ее границ и гена нопалинсинтазы [5]. Последовательности Т-ДНК заменены на *pBR322*, что обеспечивает область гомологии для любых промежуточных векторов, созданных на основе серии *pBR*.

Влияние УФ-облучения на жизнеспособность реципиентных клеток отражено на рисунке. Видимое падение жизнеспособности клеток наблюдается при длительности облучения более 20 с. В отсутствие облучения эффективность появления трансконъюгантов при переносе *pBR322-4T* в клетки штамма C58 в 10 раз выше, чем при переносе *pLGV23neo*, которая имеет небольшую по протяженности область гомологии с *Ti*-плазмидой (фрагменты  $1,5 \cdot 10^6$  и  $1,2 \cdot 10^6$ ) (таблица). При использовании в качестве реципиента штамма GV3850 эта разница еще больше. УФ-облучение реципиентных клеток перед конъюгацией приводит к изменению частоты появления трансконъюгантов, содержащих коинтеграты *Ti*-плазмиды — промежуточный вектор, которые образуются в результате рекомбинации. Эта величина в зависимости от реципиента и переносимой плазмиды увеличивается в 10 — 100 раз. Особенно отчетливо проявляется влияние УФ-облучения на эффективность появления трансконъюгантов в тех случаях, когда в клетки агробактерий переносится плазмиды, имеющая небольшую протяженность области гомологии с *Ti*-плазмидой, как в случае *pLGV23neo*. Оптимальным временем облучения реципиентных клеток является интервал 10 — 20 с, так как при более длительном облучении заметно падает жизнеспособность клеток, что приводит к уменьшению абсолютного числа колоний на чашках.

УФ-облучение, как известно, индуцирует повышение активности рекомбинационных систем бактериальной клетки. В связи с этим пред-

Влияние УФ-облучения на эффективность появления трансконъюгантов при переносе промежуточных векторов в клетки

The influence of UV irradiation on the efficiency of the exconjugant's appearing during the intermediate vector's transfer to the *A. tumefaciens* cells

Переносимая плазмида (промежуточный вектор)	Штамм-реципиент	Время облучения, с	Эффективность появления трансконъюгантов (на реципиентную клетку)	Переносимая плазмида (промежуточный вектор)	Штамм-реципиент	Время облучения, с	Эффективность появления трансконъюгантов (на реципиентную клетку)
<i>pBR322-4T</i>	C58	0	$4,7 \cdot 10^{-7}$	<i>pBR322-4T2</i>	GV3850	0	$3,9 \cdot 10^{-8}$
		10	$3,5 \cdot 10^{-6}$			10	$1,8 \cdot 10^{-6}$
		20	$2,3 \cdot 10^{-6}$			20	$6,5 \cdot 10^{-7}$
		40	$1,0 \cdot 10^{-6}$			40	$7,0 \cdot 10^{-6}$
<i>pLGV23neo</i>	C58	0	$5,0 \cdot 10^{-8}$	<i>pLGV23neo</i>	GV3850	0	$1,2 \cdot 10^{-9}$
		10	$6,0 \cdot 10^{-7}$			10	$2,1 \cdot 10^{-7}$
		20	$1,0 \cdot 10^{-6}$			20	$0,9 \cdot 10^{-6}$
		40	$5,4 \cdot 10^{-6}$			40	$0,5 \cdot 10^{-6}$

полагается, что наблюдаемое в эксперименте увеличение эффективности переноса чужеродных генов в *Ti*-плазмиду (образование коннтеграгов) обусловлено повышением частоты рекомбинации между гомологичными участками *Ti*-плазмиды и переносимых в клетки агробактерий плазмид, являющихся промежуточными векторами.

Таким образом, кратковременное облучение ультрафиолетом реципиентных клеток агробактерий перед конъюгацией можно предложить в качестве эффективного методического приема для повышения частоты переноса чужеродных генов в *Ti*-плазмиду, если для их переноса используются промежуточные векторы.

#### Резюме

Вивчали вплив УФ-опромінення реципієнтних клітин *A. tumefaciens* на частоту переносу чужерідних генів в *Ti*-плазмиду, що здійснюється за допомогою проміжних векторів. Показано, що ефективність переносу зростає в 10—100 разів після короткочасного опромінення реципієнтних клітин. УФ-опромінення *A. tumefaciens* перед кон'югацією пропонується як засіб для збільшення ефективності переносу чужерідних генів у *Ti*-плазмиду *A. tumefaciens* при використанні для цього проміжних векторів.

#### Summary

The influence of UV irradiation of recipient *A. tumefaciens* cells on the frequency of the foreign gene transfer into *Ti* plasmid via intermediate vectors has been investigated. It has been established that the frequency of this process after transient irradiation of recipient cells is 10-100 times higher than the frequency observed without irradiation. This fact is suggested to be used as an effective method to increase the foreign gene transfer frequency into *Ti* plasmid if the intermediate vectors are applied for it.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Site-specific mutagenesis of *Agrobacterium Ti* plasmid and transfer of genes to plant cells / S. Leemans, C. Shaw, R. de Blaere et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1981.— 1, N 2.— P. 149—164.
2. A binary plant vector strategy based on separation of Vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens Ti* plasmid / A. Hoekema, P. R. Hirsch, P. J. J. Hookaas, R. A. Schilperoort // Nature.— 1983.— 303, N 5919.— P. 179—180.
3. Intergenic transfer and exchange recombinant of restriction fragments cloned in *pBR 322*: a novel strategy for the reversed genetics of the *Ti* plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* / E. van Huete, H. Joos, M. Maes et al. // The EMBO J.— 1983.— 2, N 3.— P. 411—417.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 420 с.
5. Systematic design of a *Ti* plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity / P. Zambraski, H. Joos, C. Genetello et al. // The EMBO J.— 1983.— 2, N 3.— P. 2143—2150.

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

Получено 28.06.90