

12. Ofengand J., Henes C. The function of pseudouridylic acid in transfer ribonucleic acid // J. Biol. Chem.—1969.—244, N 22.—P. 6241—6253.
13. The mechanism of codon-anticodon interactions in ribosomes. Heterogeneity of tRNA complexes with 70S ribosomes of *Escherichia coli* / S. V. Kirillov, V. I. Makchno, V. B. Odintsov, Yu. P. Semenov // Eur. J. Biochem.—1978.—89, N 1.—P. 305—313.

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

Получено 20.03.86

УДК 575.155:575.224.46

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНОМ SV40, В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С. М. Ландау, Л. К. Сасина, Н. А. Чашин, Л. И. Чашина

В настоящее время широко применяют векторы для эукариотических клеток на основе ДНК вируса SV40. Основой для исследования функциональной активности таких векторов должно быть изучение их способности реплицироваться в перmissive системе клеток.

Однако в последнее время стало известно, что векторы на основе *pBR322* содержат «ядовитые» последовательности, препятствующие репликации рекомбинантных молекул в культурах клеток млекопитающих [1—3]. В связи с этим мы исследовали возможность индуцирования репликации рекомбинантных молекул, состоящих из плазмиды *pBR325* (производная *pBR322*) и полного генома SV40, в перmissive системе клеток CV1 с помощью обезьяньего вакуолизирующего вируса 40.

В перевиваемой системе клеток CV1 изучали репликацию бактериальных рекомбинантных плазмид, содержащих геном SV40. Исследовали следующие плазмиды: 1) *pYM*, созданную на основе *pBR322* и содержащую один полный геном SV40 [1] и 2) сконструированные нами на основе SV40 плазмиды *pSV2*, *pSV9*, содержащие один (*pSV2*) и два (*pSV9*) полных генома SV40 [4]. Все исследованные химерные плазмидные молекулы были получены с помощью рестриктазы *Bam*III, которая расщепляет молекулу ДНК SV40 в позднем районе, кодирующем капсидные белки вириона, и гидролизует плазмиды *pBR322* или *pBR325* в районе гена устойчивости к тетрациклину.

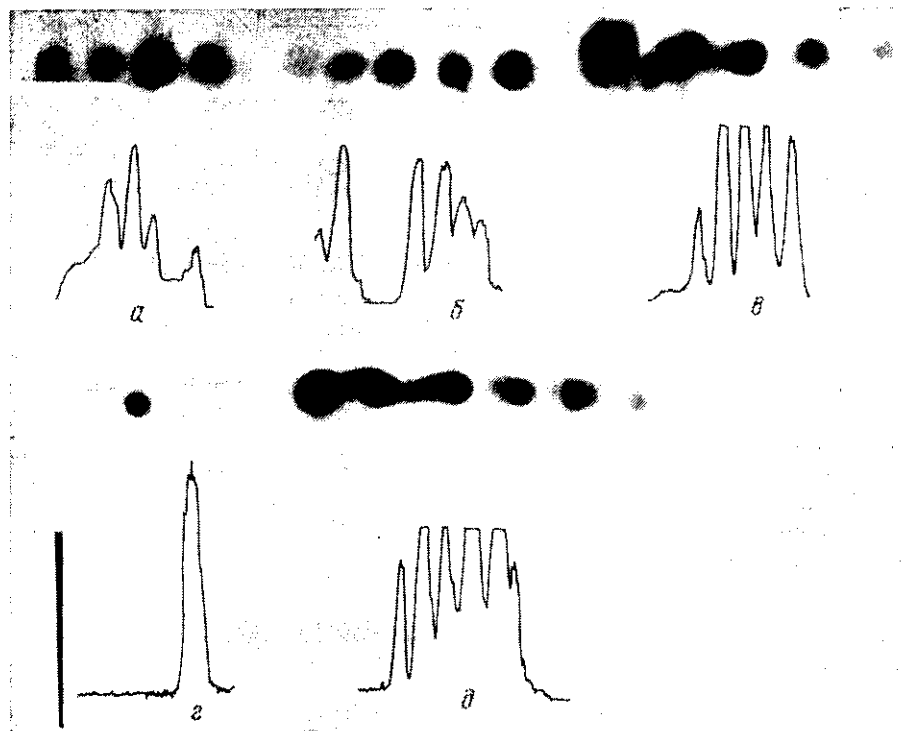
Для изучения репликации бактериальными плаزمидами (0,5—0,6 мкг) обрабатывали культуры клеток млекопитающих во флаконах объемом 50 мл в присутствии кальций-фосфатного преципитата. Плазмидные ДНК из клеток млекопитающих выделяли в динамике инфекции [3]. Проводили дот-гибридизацию выделенных из культур клеток CV1 плазмидных ДНК с ³²P-SV40 (3·10⁷ имп/мкг) или ³²P-*pBR322* (10⁸ имп/мкг).

Еще до изучения репликации рекомбинантных бактериальных плазмид в клетках млекопитающих необходимо было выяснить динамику синтеза обезьяньего вакуолизирующего вируса SV40. Было показано, что при инфицировании обезьяньих клеток вирусной суспензией пик синтеза вирусной ДНК обнаруживается через одни или двое суток, что совпадает с данными литературы [5]. Позднее количество свободной вирусной ДНК уменьшается. Через 6—7 сут практически не удается обнаружить вирусной ДНК в эписомальном состоянии (рисунок, а).

Синтез ДНК плазмиды *pYM*, так же как и вирусной ДНК, возрастает через сутки (рисунок, б). Однако в отличие от ДНК вируса SV40 рекомбинантную плазмиду *pYM* удается выявить даже спустя 7 сут после трансфекции (рисунок, в), что свидетельствует о длительной саморазмножительной ее репликации в культурах клеток млекопитающих. Эти данные согласуются с данными литературы [3]. Расчет соотношения площадей пиков автордиограммы на рисунке, б, показал, что площадь пика нулевой точки инфекции относится к площадям пиков первых, вторых и третьих суток инфекции как 1 : 1; 4 : 1; 3 : 1,7 соответственно.

То есть количество плазмидной ДНК увеличивается примерно вдвое (1,7 раза) по сравнению с количеством ДНК, связавшейся с культурой клеток сразу после обработки (нулевая точка инфекции).

Первое пятно на рисунке, б, соответствует 0,4 мкг ДНК *pYM*. Площадь пика ДНК на третьи сутки инфекции больше в 2,3 раза, т. е. соответствует 0,92 мкг. По-видимому, можно ориентировочно рассчитать



Изучение репликации рекомбинантных плазмид, содержащих геном SV40 в культурах обезьяньих клеток *CVI*, методом дот-гибридизации (а, б — гибридизация с ^{32}P -ДНК SV40, $3 \cdot 10^7$ имп/мкг; в — д — с ^{32}P -*pBR322*, 10^8 имп/мкг; последовательность пятен слева направо, пиков соответствующих автордиограмм — справа налево): а — репликация ДНК вируса SV40 (нулевая точка инфекции, 1, 2, 3-и сут); б — репликация плазмиды *pYM* (0,4 мкг, нулевая точка, 1, 2, 3-и сут); в — то же (нулевая точка, 1, 3, 4, 7-е сут); з — репликация рекомбинантной плазмиды *pSV2* (нулевая точка, 1, 2, 3, 4, 5-е сут); д — репликация химерной плазмиды *pSV9* при совместном введении с вирусом SV40 (нулевая точка, 1, 2, 3, 4, 5-е сут)

Studies in replication of recombinant plasmids containing SV40 genome in cultures of simian *CVI* cells by the dot-hybridization technique (а, б — hybridization with ^{32}P -SV40 DNA, $3 \cdot 10^7$ pulse/ μg , в-д — with ^{32}P -*pBR322*, 10^8 pulse/ μg ; sequence of spots from the left to the right, and that of peaks of the corresponding autoradiograms from the right to the left): а — replication of SV40 DNA (zero point of infection, 1st, 2nd, 3d days); б — replication of *pYM* plasmid (0.4 μg , zero point, 1st, 2nd, 3d days); в — the same (zero point, 1st, 3d, 4th, 7th days); з — replication of recombinant *pSV2* plasmid (zero point, 1st, 2nd, 3d, 4th, 5th days); д — replication of chimeric *pSV9* plasmid simultaneously introduced with SV40 virus (zero point of infection, 1st, 2nd, 3d, 4th, 5th days)

количество копий реплицирующихся плазмид в клетке. Известно, что сам вирус SV40 или его ДНК инфицируют лишь часть клеток культуры *CVI*. По нашим предыдущим данным [6], ДНК вируса SV40 инфицирует до 6 % клеток. Если предположить, что лишь в 6 % клеток реплицируется *pYM*, то каждая инфицированная клетка на третьи сутки репликации плазмиды будет содержать примерно 10^5 молекул ДНК (во флаконе (50 мл) содержится примерно 10^6 клеток *CVI*).

Результаты введения сконструированных нами бактериальных плазмид *pSV2* и *pSV9* в культуры клеток млекопитающих показали, что они не реплицируются в перmissive для них культурах клеток *CVI* (рисунок, з). ДНК плазмиды *pSV2* или *pSV9* удавалось выявить мето-

дом дот-гибридизации с ^{32}P -*pBR322* только на нулевой точке инфекций, т. е. при выделении ДНК из культур клеток сразу же после их обработки.

Уже через сутки ДНК *pSV2* или *pSV9* методом дот-гибридизации выявить не удавалось, из чего следовало, что при отсутствии репликации плазмидной ДНК в клетках млекопитающих ее количество резко уменьшается. Это находит свое объяснение в литературе [3]. Показано, что плазида *pBR322* содержит «ядовитые» последовательности, препятствующие репликации рекомбинантных ДНК в культурах клеток млекопитающих. Эти же авторы [3] показали, что плазида *pYM* не содержит «ядовитых» последовательностей и поэтому свободно реплицируется в культурах клеток.

Для того чтобы индуцировать репликацию химерных рекомбинантных плазмид *pSV2* или *pSV9* в культурах клеток, мы вводили эти плазмиды одновременно с вирусом SV40, полагая, что при попадании химерных молекул и вирусных частиц в одну клетку синтезированный Т-антиген вируса свяжется с origin SV40 плазмид *pSV2* или *pSV9*, индуцируя их репликацию. И действительно, совместная трансфекция вируса SV40 с плазмидой *pSV2* или *pSV9* приводила к репликации этих бактериальных плазмид в культурах клеток млекопитающих (рисунок, *б*). Репликация плазмидной ДНК наблюдается в течение тех же сроков, что и репликация вируса SV40. На пятые сутки количество плазмидной ДНК резко уменьшается (рисунок, *в*).

Таким образом, с помощью вируса SV40 можно индуцировать репликацию бактериальных плазмид, содержащих геном SV40, в клетках млекопитающих, что открывает новые перспективы для использования этого методического подхода.

STUDIES IN REPLICATION OF PLASMIDS CONTAINING SV40 GENOME IN MAMMALIAN CELLS

S. M. Landau, L. K. Sasina, N. A. Chashchin, L. I. Chashchina

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The replication of the bacterial recombinant plasmids containing SV40 genome has been studied in cultures of simian CV1 cells. It is shown that replication of recombinant DNAs having «poison sequences» may be induced by introduction of the vacuolating SV40 virus simultaneously with chimeric plasmids containing SV40 genome.

1. Gynheung A., Hidaka K., Siminovitch L. Expression of bacterial β -galactosidase in animal cells // Mol. and Cell. Biol.—1982.—2, N 12.— P. 1628—1632.
2. O'Hare K., Benoist C., Bretnach R. Transformation of mouse fibroblast to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 3.— P. 1527—1531.
3. Lusky M., Botchan M. Inhibition of SV40 replication of simian cells by specific *pBR322* DNA sequences // Nature.—1981.—293, N 3.— P. 79—81.
4. Сасина Л. К., Ландау С. М., Кордюм В. А. Конструирование и анализ гибридных плазмид, содержащих геном вируса SV40 // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1986.— № 1.— С. 26—30.
5. Cereghini S., Yaniv M. Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication // EMBO J.—1984.—3, N 6.— P. 1243—1253.
6. Ландау С. М., Гудзь-Горбань А. П., Костомаха Л. К. Выявление функциональной активности ДНК SV40 // Молекуляр. биология.—1983.— Вып. 35.— С. 10—13.

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

Получено 28.03.86