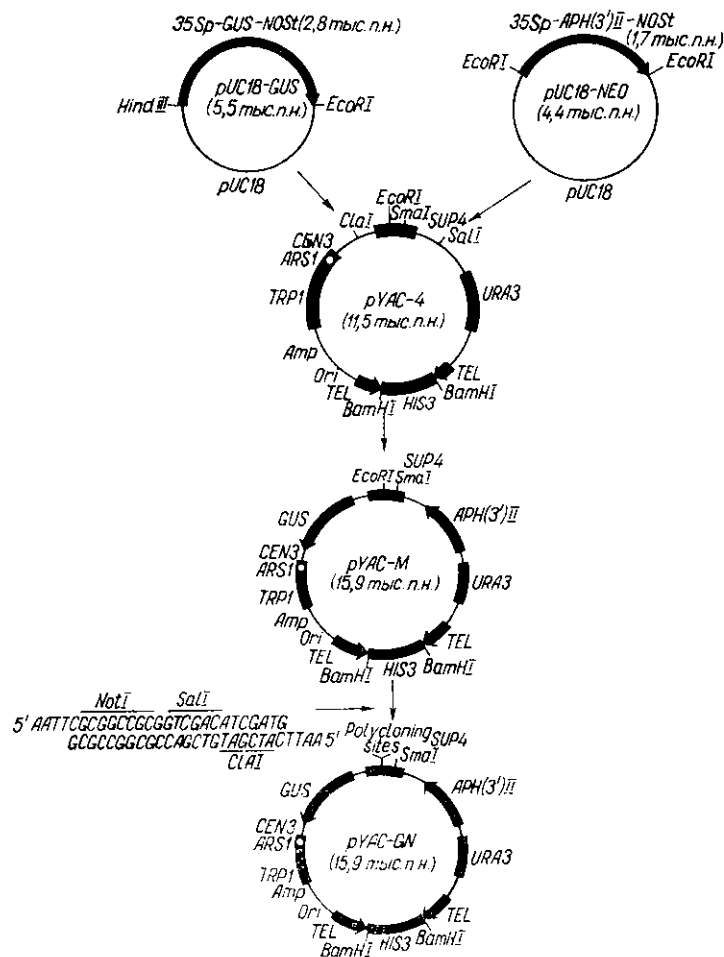


В. И. Климяк

рУАС-GN, ИСКУССТВЕННЫЙ ХРОМОСОМНЫЙ ВЕКТОР ДРОЖЖЕЙ, КОДИРУЮЩИЙ GUS И APH(3')II РЕПОРТЕРНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Создан новый вектор рУАС-GN, позволяющий проводить функциональный анализ больших фрагментов ДНК (100—1000 тыс. п. о.) в клетках высших растений.

Разработка методов переноса клонированных фрагментов ДНК в клетки высших растений играет решающую роль в изучении контроля экспрессии генов, их роли в различных биологических процессах, а также в решении ряда прикладных задач современной биотехнологии растений. Однако размер фрагментов клонированной ДНК, которые могут



быть перенесены в растительные клетки, ограничен емкостью бактериальных векторов (плазмиды, бактериофаги, космиды) и в большинстве случаев не превышает 50 тыс. п. о. Разработанная Бурке с соавт. [1] система клонирования в искусственных линейных хромосомах *Saccharomyces cerevisiae* (YAC) обладает рядом преимуществ над методами, базирующимися на традиционных системах клонирования в *Escherichia coli*. Во-первых, в YAC могут быть клонированы фрагменты ДНК раз-

мером несколько сотен тысяч пар оснований. Во-вторых, предполагается, что дрожжи толерантны к различным типам эукариотической ДНК, которая не реплицируется в бактериях.

Первые успешные переносы *YAC* с клонированными последовательностями человеческой ДНК и геном устойчивости к неомицину осуществлены в клетки млекопитающих посредством индуцированного полиэтилентглицолом слияния со сферопластами *S. cerevisiae* [2, 3]. Для разработки системы переноса *YAC* в растительные клетки и облегчения процесса селекции растений-трансформантов нами сконструирован новый вектор *pYAC-GN*. Схема поэтапного конструирования вектора представлена на рисунке (*pYAC-4* и линия АВ1380 *S. cerevisiae* получены от д-ра Ольсона (Сант Луис, США), векторы с репортерными генами — от д-ра Ференца Нодя (Сегед, Венгрия)). В *Sall*- и *Clal*-сайты *pYAC-4* последовательно клонированы *EcoRI*- и *HindIII-EcoRI*-фрагменты ДНК из *pUC18-NEO* и *pUC18-GUS* соответственно. Клонирование фрагментов проводили по затупленным концам. Получен промежуточный вектор *pYAC-M*, содержащий гены β-глюкуронидазы и аминокликозид-фосфотрансферазы II под 35S промотором вируса *CaMV*, что позволяет проводить селекцию растений-трансформантов по устойчивости к неомицину, канамицину, а также по активности β-глюкуронидазы. Ориентацию клонированных генов определяли, измеряя длины продуктов двойного перевара промежуточного вектора. Вектор содержит только два сайта клонирования (*EcoRI* и *SmaI*), локализованных в гене *SUP4*. Клонирование в *EcoRI*-сайт *pYAC-M* синтетического полилинкера, включающего сайты рестрикции для *NotI*-, *Sall*- и *Clal*-рестриктаз, являющихся редкощепящимися для растительной ДНК [4], не привело к разрушению функций гена *SUP4*, что следовало из опытов по трансформации линии АВ1380 *S. cerevisiae*. Это позволяет проводить как цветной скрининг, так и позитивную селекцию рекомбинантных молекул ДНК.

Конструирование геномных библиотек высших растений на основе нового вектора *pYAC-GN* и разработка системы переноса *YAC* в клетки растений создают возможности как для выделения генов путем комплементации мутантных фенотипов, так и для конструирования искусственных минихромосом высших растений.

Резюме

Сконструировано новый вектор *pYAC-GN*, предназначенный для функционального анализа великих фрагментов ДНК (100—1 000 тыс. п. о.) у клетках высших растений. Для облегчения селекции растительных клеток, трансформированных *YAC*, исходный вектор *pYAC-4* был модифицирован инсерциями *GUS* та *APH(3')II* репортерных генов под 35S промотором вируса *CaMV* у сайты *Clal* і *Sall* відповідно. *pYAC-GN* містить також синтетичний полілінкер з *NotI*-, *Clal*-, *Sall*-сайтами рестрикції, що вбудований в *EcoRI*-сайт *SUP4*.

Summary

The vector *pYAC-GN* has been constructed in order to be able to introduce *YAC* clones into plant cells for functional analysis of large fragments of DNA. To facilitate the selection of plant cells which have taken up *YACs*, the *pYAC-4* was modified by insertion of *GUS* and *APH(3')II* reporter genes under 35S promoter of *CaMV* into the *Clal* and *Sall* sites respectively. The polylinker containing *NotI*, *Clal* and *Sall* unique restriction sites was also introduced into *EcoRI* site of *SUP4*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burke D. T., Carle G. F., Olson M. V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors // Science.— 1987.— 236, N 4789.— P. 806—812.
2. Transfer of yeast artificial chromosome carrying human DNA from *Saccharomyces ce-*

- revisiae* into mammalian cells // V. Pachnis, L. Pevny, R. Rothstein, F. Costantini // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— 87, N 13.— P. 5109—5113.
3. Pavan W. I., Hieter Ph., Reeves R. II. Modification and transfer into an embryonal carcinoma cell line of a 360-kilobase human-derived yeast artificial chromosome // Mol. and Cell. Biol.— 1990.— 10, N 8 — P. 4163—4169.
4. Ganai M. W., Tanksley S. D. Analysis of tomato DNA by pulsed field gel electrophoresis // Plant Mol. and Biol. Rep.— 1989.— 7, N 1.— P. 17—27

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91

УДК 577.152.5

Л. А. Ситайло

ХЛОРОПЛАСТНАЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА I ТИПА ИЗ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА

Из полученных на ступенчатом градиенте изоосмотического перколла хлоропластов из листьев гороха выделена фракционированием в двухфазной системе сульфат аммония / полиэтиленгликоль-6000 с дальнейшей очисткой хроматографией на колонках хлоропластная ДНК-топоизомераза. Зависимость релаксирующей активности фермента от ионов Mg^{2+} , блокирование ее бромистым этидием, отсутствие стимуляции релаксирующей активности полиамминами: спермидином, спермином, кадаверином, а также характер распределения топоизомеров в геле позволяют охарактеризовать топоизомеразу как прокариотическую I типа. Исследовано действие различных кофакторов на релаксирующую активность фермента.

Введение. Суперспирализация ДНК в клетках вызывает много топологических проблем, которые должны разрешаться клеткой для обеспечения протекания нормальных процессов репликации, транскрипции, рекомбинации и в конечном итоге экспрессии генетической информации [1, 2]. Ферменты, контролирующие топологические состояния ДНК, — ДНК-топоизомеразы, — играют ключевую роль в выполнении физиологических функций ДНК. В эу- и прокариотических клетках топологические состояния ДНК регулируют два класса ферментов: ДНК-топоизомеразы I и II типов; топоизомеразы I типа — с помощью механизма, включающего введение одноцепочечного разрыва в одну из цепей ДНК, проведение нативной цепи через разрыв и восстановление нативности разорванной цепи [3, 4]. Хотя ДНК-топоизомеразы I типа не строго необходимы для жизнеспособности эукариотических клеток [5], они, тем не менее, существенно важны для организации хроматина [6], митоза [7], репликации ДНК [8], рекомбинации [9], транскрипции [10].

ДНК-топоизомеразы II типа изменяют топологию ДНК с помощью механизма, обеспечивающего введение двухцепочечного разрыва в ДНК, проведение сегмента ДНК через разрыв и восстановление разрыва [3]. В отличие от топоизомераз I типа они необходимы для жизнеспособности эукариотической клетки [11]. Исследования, проведенные за последние несколько лет, показали, что оба типа ферментов являются первичными клеточными мишенями для действия различных антибиотиков, обладающих противоопухолевой активностью [12]. Топоизомеразы I типа — для цитотоксического алкалоида камптотецина [13]; топоизомеразы II типа — для широкого круга химиотерапевтических антибиотиков, включающего адриамицин, эллиптицин, амсакрин, этопозид и тенипозид, а также их различные производные [14, 15].

ДНК-топоизомеразы из растительных организмов изучены слабо. На сегодняшний день имеется несколько работ по выделению и физико-химическим характеристикам этого класса ферментов [16—18]. Совсем мало среди них исследований, посвященных изучению ДНК-топоизомераз из хлоропластов [19, 20].

© Л. А. Ситайло, 1991.