

correlation between the level of heterosis manifestation and the quantity of polysomes in the total ribosomal preparation, the functional activity of polysomes and aminoacylation of tRNA *in vitro* is established in the hybrid generation of plants.

1. Костышин С. С. Полифункциональность гетерозиса у кукурузы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Киев, 1985.—51 с.
2. Костышин С. С., Баран М. М., Оплачко Л. Т. Различная интенсивность биосинтеза белка у гетерозисных гибридов кукурузы // Физиология и биохимия культурных растений.— 1982.—14, № 2.— С. 123—126.
3. Davies E., Larkins S. A., Knight R. H. Polysomes from peas. An improved method for their isolation in the absence of ribonuclease inhibitors // Plant Physiol.— 1972.—50, N 4.— P. 581—584.
4. Roberts B. E., Patterson B. M. Efficient translation to tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA on a cell-free system from commercial wheat germ // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.—70, N 5.— P. 2330—2334.
5. Mans R. J., Novelli G. D. Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by filter paper disk method // Arch. Biochem. and Biophys.— 1961.—94, N 1.— P. 48—53.
6. Некоторые данные об изменении способности транспортных РНК печени кроликов акцептировать аминокислоты при голодании / Г. Х. Мацука, Т. П. Бабий, Э. Б. Сквирская и др. // Укр. биохим. журн.— 1969.—41, № 6.— С. 655—659.
7. Демидов С. В., Ельская А. В. Сравнение акцепторной активности тРНК печени кроликов в онтогенезе // Там же.— 1979.—51, № 5.— С. 503—507.
8. Маслов Ю. Т. Статистическая обработка данных биохимических исследований // Методы биохимического анализа растений.— Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978.— С. 163—187.
9. Кудоярова Г. Р., Еркеев М. И. Сравнительное изучение активности трансляционного аппарата в листьях гибридов кукурузы и их исходных форм // Физиология растений.— 1983.—36, № 4.— С. 703—708.

Черновиц. гос. ун-т

Получено 21.04.86

УДК 57.085.23:577.216.9

## РЕПЛИКАЦИЯ В ПРОТОПЛАСТАХ ТАБАКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

В. А. Кордюм, В. А. Труханов, Е. К. Топорова, В. Н. Шульженко,  
Т. Н. Чеченева

**Введение.** На фоне впечатляющих достижений генной инженерии микроорганизмов исследования по переносу генетической информации у растений находятся еще на начальных этапах. Одним из важнейших и наиболее сложных моментов этой работы является создание векторов для высших растений.

По механизму действия векторы для растений, как и векторы для всех других биологических объектов, могут быть либо интегративными, либо репликативными. К интегративным векторам принадлежат *Ti*- и *Ri*-плазмиды и их искусственно полученные производные [1—5]. Прообразом репликативных векторов могут служить ДНК вируса мозаики цветной капусты [6—8] и ДНК-копии некоторых РНК-содержащих вирусов растений [8—10]. Как и любой другой вектор, вектор для растений может быть успешно использован, если удастся просто и быстро осуществить его наработку в препаративных количествах и стабильно поддерживать в хорошо изученных и просто культивируемых клетках, чаще всего бактериальных. Этот вектор должен иметь также удобные маркеры, содержать уникальные сайты рестрикции и т. п. Но возможны и иные варианты. Например, *Ti*-плазида несет природно существующий репликаон, обеспечивающий ее стабильное функционирование в клетках *Agrobacterium tumefaciens*, однако она не многокопийна и не обладает хорошо изученными маркерами. Работать с ней общепринятыми методами невозможно. Поэтому наработка, амплификация, селекция и введение в нее заданных фрагментов ДНК обеспечиваются особыми промежуточными векторами. У репликативных векторов для высших эукариот обычно вводятся дополнительные последовательности, например репликаона *ColE1*, маркерные гены и т. д.

В статье приводятся результаты изучения репликации в протопластах табака созданного авторами репликативного вектора, являющегося комбинацией известных ранее векторов и элементов генома высших растений (молекулярная масса  $4,6 \cdot 10^6$ ).

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на мезофильных протопластах, полученных из диплоидов табака сорта Самсун в асептических условиях. Для получения протопластов участки молодых листьев со снятым эпидермисом инкубировали в ферментной смеси, состоящей из 0,075 % целлюлозы R-10 и 0,1 % мацерозима R-10, в течение 14—16 ч при 24—26 °С. Отмывку протопластов от ферментной смеси, последующие манипуляции и культивирование проводили, используя среду Nagata—Такебе с модификациями: удаление  $KNO_3$ , уменьшение содержания  $NH_4NO_3$  до 200 мг/л и ман-



Рис. 1. Электрофореграммы ДНК лизата протопластов и рекомбинантных плазмид: а — лизат протопластов с ДНК вектора (5 мкг/мл); б — лизат контрольных протопластов; в, г — плазмидные ДНК

Fig. 1. Electrophoregrams of DNA from protoplast lysate and recombinant plasmids: а — protoplast lysate with vector DNA introduced (5  $\mu$ g/ml); б — lysate of control protoplasts; в, г — plasmid DNAs

Рис. 2. Электрофореграммы ДНК лизата протопластов и рекомбинантных плазмид: а — лизат протопластов с включенной ДНК вектора (5 мкг/мл) и меткой; б — плазмидная ДНК с добавлением метки; в — лизат протопластов с включенной ДНК плазмиды *pBR322* и меткой; г — лизат протопластов с включенной ДНК вектора (50 мкг/мл) и меткой; д, е — лизаты протопластов с включенной ДНК вектора и меткой, внесенной перед лизисом; ж — лизат протопластов с меткой и плазмидной ДНК, внесенной перед лизисом; з — лизат протопластов с меткой

Fig. 2. Electrophoregrams of DNA from protoplast lysate and recombinant plasmids: а — protoplast lysate preincubated with vector DNA (5  $\mu$ g/ml) and labelled precursor; б — plasmid DNA with addition of label; в — protoplast lysate preincubated with plasmid *pBR322* DNA and labelled precursor; г — protoplast lysate preincubated with vector DNA (50  $\mu$ g/ml) and labelled precursor; д, е — protoplast lysate with vector DNA introduced, labelling was prior to lysis; ж — lysate of protoplasts preincubated with labelled precursor, plasmid DNA introduced prior to lysis; з — lysate of protoplasts preincubated with labelled precursor

Рис. 3. Авторадиограммы ДНК лизата протопластов и рекомбинантных плазмид, разделенных электрофорезом в агарозном геле: а — лизат протопластов с включенной ДНК вектора (5 мкг/мл) и меткой; б — плазмидная ДНК с добавлением метки; в — лизат протопластов с включенной ДНК плазмиды *pBR322* и меткой; г — лизат протопластов с включенной ДНК вектора (50 мкг/мл) и меткой; д, е — лизаты протопластов с включенной ДНК вектора и меткой, внесенной перед лизисом; ж — лизат протопластов с меткой и плазмидной ДНК, внесенной перед лизисом; з — лизат протопластов с меткой

Fig. 3. Autoradiograms of DNA from protoplasts lysate and recombinant plasmids separated in agarose gel: а — protoplast lysate preincubated with vector DNA (5  $\mu$ g/ml) and labelled precursor; б — plasmid DNA with addition of label; в — protoplast lysate preincubated with plasmid *pBR322* DNA and labelled precursor; г — protoplast lysate preincubated with vector DNA (50  $\mu$ g/ml) and labelled precursor; д, е — protoplast lysate with vector DNA introduced, labelling was prior to lysis; ж — lysate of protoplasts preincubated with labelled precursor, plasmid DNA introduced prior to lysis; з — lysate of protoplasts preincubated with labelled precursor

шитола до концентрации 0,4 М [11—13], увеличение содержания БАП до 1,5 мг/л. Из среды полностью исключали неорганический фосфор ( $KH_2PO_4$ ).

Для стабилизации протопластов обеспечивали изотонические условия на всех этапах работы. После окончания экспозиции протопласты разрушали лизисом, для чего в инкубационную среду добавляли SDS до конечной концентрации 1 % и в течение 2 мин встряхивали на вибрационном миксере. Электрофорез (напряженность 2,5 В/см, сила тока 1 мА на трубочку) проводили в течение 18—19 ч в 0,9 %-м агарозном геле, приготовленном на трис-ацетатном буфере (рН 8,0) при температуре окружающей среды. Авторадиографию вели стандартным контактным методом с пленкой РМ-1.

Возможность загрязнения исследуемого материала контаминирующей микрофлорой исключалась специальной обработкой протопластов [14] и соответствующими контрольными высевами на питательные среды на всех этапах работы.

**Результаты и обсуждение.** При наработке вектора по методу [15] в *E. coli* выход плазмидной ДНК составлял 400—500 мкг из 1 л бактериальной культуры. Некоторые модификации разработанной ранее [13] методики обеспечивали введение плазмидной ДНК в протопласты в большом количестве.

Критерием прохождения в протопластах репликации внесенного вектора считалось включение в него меченных по фосфору предшественников биосинтеза нуклеиновых кислот.

К протопластам добавляли очищенную немеченую ДНК вектора и создавали условия, обеспечивающие начало ее вхождения в протопласты (длительность экспозиции — 4—5 ч). После внесения меченого предшественника инкубация продолжалась еще 21—22 ч в темноте при 24—26 °С. Затем пробы разбавляли изотонической средой в 11 раз. Протопласты осаждали центрифугированием в течение 3 мин при скорости 700 об/мин и ресуспендировали в изотонической среде для оценки жизнеспособности, в лизирующей — для их разрушения.

Лизат протопластов без предварительного осветления наносили на гели для электрофореза: на каждую дорожку плоского геля — 50 мкл лизата, на каждую трубочку с гелем — 100 мкл лизата, содержащего вдвое больше исследуемого материала. После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолете для получения общей картины распределения ДНК-содержащего материала, а затем сушили и ставили на автордиографию.

В ряде независимых экспериментов и разных повторах одного опыта применяли различные условия электрофореза и экспозиции при автордиографии, чтобы не произошло случайного совмещения ДНК-содержащего материала собственно клеточного и векторного происхождений.

Для исключения имитации включения метки в результате адсорбционных процессов, протекающих в такой сложной многокомпонентной системе, как клеточные лизаты, были поставлены специальные контрольные опыты:

- 1) добавление к протопластам метки в те же сроки, что в опыте, но при отсутствии вектора (рис. 2, з; 3, з);
- 2) добавление к протопластам метки по аналогии с опытом, но при введении вектора непосредственно перед разрушением протопластов (рис. 2, ж; 3, ж);
- 3) добавление к протопластам вектора в те же сроки, что в опыте, но при внесении метки непосредственно перед лизисом протопластов (рис. 2, д, е; 3, д, е).

Одновременно с этими вариантами осуществлен дополнительный контроль, в котором вместо изучаемого экспериментального вектора использовали хорошо известную рекомбинантную плазмиду *pBR322* (рис. 2, в; 3, в).

На рис. 1—3 представлены фотографии окрашенных гелей и их автордиограммы, полученные в опытах с варьированием некоторых параметров. На рис. 1 приведены электрофореграммы лизата протопластов и различных рекомбинантных молекул, использованных одновременно в одном опыте без внесения метки. На рис. 2 и 3 — фотографии гелей, полученных в опыте с использованием той же партии протопластов и тех же рекомбинантных плазмид, но с добавлением меченого предшественника ДНК. На рис. 2 даны изображения гелей до высушивания, на рис. 3 — автордиограммы высушенных гелей. В результате высушивания происходит определенная деформация гелей, что ведет к некоторому смещению полос. Следует учитывать, что в процессе окрашивания и промывки гелей частицы разрушенных протопластов, включившие метку и не вошедшие в гель из-за своих крупных по сравнению с пораи геля размеров, могут смываться, в результате чего торцы автордиограмм могут иметь разную светимость.

Ранее было установлено [13, 16], что при введении в протопласты плазмидной ДНК в один протопласт может включаться до  $10^6$  молекул ДНК. Такое высокое число проникающих в протопласт молекул вектора может вызвать ослабление их репликации. Действительно, добавление к инкубационной смеси вектора в количестве, в 10 раз меньшем чем обычно, резко повышало уровень включения метки (рис. 2, а; 3, а). На фотографии видны две полосы, соответствующие двум верхним полосам на рис. 1, в и 1, г.

Большое количество полос в исходном препарате вектора можно объяснить его некоторой нестабильностью в *E. coli*, в результате чего образуются производные, дающие дополнительные полосы. Ни в одном из контрольных вариантов не обнаружено достаточно ярких полос, которые могли бы поставить под сомнение репликацию вектора.

Таким образом, показано, что в протопластах табака имеет место репликация экспериментально созданного вектора для растительных объектов. Полученные данные

пока не дают возможности определить копийность рекомбинантной молекулы в растительных объектах, на уровне которой она способна обеспечить свое воспроизведение. Однако соразмерность плотности засветки на автордиограммах от вектора и внесленного суммарного лизата клеток, не вошедшего в гель, свидетельствует о высокой интенсивности репликации рекомбинантных молекул.

#### REPLICATION OF RECOMBINANT DNA IN TOBACCO PROTOPLASTS

V. A. Kordyum, V. A. Trukhanov, E. K. Toporova, V. N. Shulzhenko, T. N. Checheneva

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

#### Summary

Replication in tobacco protoplasts of vector including fragments of previously known vectors and elements of higher plants genome was detected.

1. *Transcription of zein gene introduced into sunflower using a Ti plasmid vector* / M. A. Matzke, M. Susani, A. N. Binns et al. // EMBO J.—1984.—3, N 7.—P. 1525—1531.
2. *Inheritance of functional foreign genes in plants* / R. B. Horsch, R. T. Fraley, S. G. Sanders et al. // Science.—1984.—223, N 4635.—P. 496—498.
3. *A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and  $\alpha$ -actin in plant tumors* / C. Koncz, F. Kreuzaler, Z. Kalman et al. // EMBO J.—1984.—3, N 5.—P. 1029—1037.
4. *Wetzer W. J. Agrogenetics researchers express plant genes in tobacco plantlets* // Bio/Technology.—1983.—1, N 6.—P. 461—462.
5. *Barton K. A., Brill W. J. Prospects in plant genetic engineering* // Science.—1983.—219, N 4585.—P. 671—676.
6. *Gronenborn B. Cauliflower mosaic virus: a possible vector for genetic engineering in plants* // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.—1984.—365, N 3.—P. 217—218.
7. *Hull R. Genetic engineering in plants. The possible use of cauliflower mosaic virus DNA as a vector* // Plant cell cult. results and perspectives.—Amsterdam: Elsevier, 1980.—P. 219—224.
8. *Hull R., Davis J. W. Genetic engineering with plant viruses and their potential as vectors* // Adv. Virus Res.—1983.—28.—P. 1—33.
9. *Double-stranded cDNAs of hop stunt viroid are infectious* / T. Meshi, M. Ishikawa, T. Ohno et al. // J. Biochem.—1984.—95, N 5.—P. 1521—1524.
10. *Expression of zein genes in Acetabularia* / G. Neuhaus, G. Neuhaus Url, H. G. Schweiger et al. // Eur. J. Cell. Biol.—1984.—33, N 5.—P. 26.
11. *Gallun E., Raveh D. In vitro culture of tobacco protoplasts: survival of haploid and diploid protoplasts exposed to X-ray radiation at different times after isolation* // Radiat. Bot.—1975.—15, N 1.—P. 79—82.
12. *Культура изолированных протопластов* / Ю. Ю. Глеба, Л. Г. Швыдкая, Р. Г. Бутенко и др. // Физиология растений.—1974.—21, № 3.—С. 598—605.
13. *Изучение проникновения, состояния и возможности экспрессии плазмидной ДНК в протопластах табака* / Е. К. Топорова, Т. Н. Чеченева, В. А. Кунах и др. // Молекуляр. биология.—1982.—Вып. 32.—С. 39—44.
14. *Чеченева Т. Н., Войтюк Л. И., Кунах В. А. Культивирование протопластов Nicotiana tabacum в присутствии антибиотиков* // Там же.—1979.—Вып. 24.—С. 58—62.
15. *Clewell D. B., Helinski D. R. Supercoiled circular DNA-protein complex in E. coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1969.—62, N 2.—P. 1159—1166.
16. *Судьба плазмидной ДНК при ее введении в протопласты табака* / Е. К. Топорова, Т. Н. Чеченева, В. А. Труханов и др. // Докл. АН СССР.—1983.—269, № 5.—С. 1212—1214.

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

Получено 13.08.85