

## КЛОНИРОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ГЕНОМА КУКУРУЗЫ, СПОСОБНЫХ К АВТОНОМНОЙ РЕПЛИКАЦИИ В *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

В. Н. Шульженко, В. А. Кордюм

Рекомбинантные молекулы, автономно реплицирующиеся в дрожжах, содержат дрожжевую двухмикронную ДНК, несущую участок начала репликации. Если вместо дрожжевой 2 мк ДНК в такие плазмиды встраивать фрагменты ДНК из различных объектов, то некоторые из них могут выполнять функцию автономно реплицирующихся последовательностей (ARS) в дрожжах.

В литературе показана принципиальная возможность клонирования ARS-последовательностей [1—6]. Необходимость работ такого рода обуславливается их возможным применением при конструировании векторных систем для эукариот.

Целью настоящей работы было клонирование фрагментов ДНК из генома кукурузы, способных обеспечивать автономную репликацию в дрожжах.

**Материалы и методы.** Среда. Бактериальные культуры выращивали на аминокислоте и среде М9. Твердую среду для них, содержащую 1,5 % агар-агара, готовили на аминокислоте. Жидкая богатая среда для выращивания дрожжей содержала 1,5 % пептона, 1 % дрожжевого экстракта, 2 % глюкозы. Твердая среда — те же компоненты и 2 % агар-агара. Жидкая селективная среда для выращивания дрожжей содержала 0,67 % INB (дрожжевая азотистая основа фирмы «Difco», США, без аминокислот), 2 % глюкозы, лейцин, триптофан, метионин (20 мкг/мл). Твердая селективная среда — те же компоненты и 2 % агар-агара.

**Штаммы и плазмиды.** В качестве исходного материала использовали ауксотрофный по лейцину и гистидину штамм дрожжей *S. cerevisiae* LL-20 (leu2-3leu2-112his3-11his3-15) и бесплазмидный штамм *E. coli* HB101. Физическая карта используемой плазмиды *pYF92* представлена на рис. 1 [7]. Эта плазида получена из Ин-та биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР.

**Выделение ДНК.** Плазмидную ДНК в препаративных количествах выделяли по методу [8]. Для скрининга бактериальных клонов плазмидную ДНК выделяли щелочным методом [9].

Растительную ДНК выделяли из кукурузной линии БС2923, как описано в [10], с очисткой в градиенте плотности хлористого цезия. К раствору растительной ДНК добавляли хлористый цезий (2,2 г: 2,2 мл раствора) и краситель бромистый этидий (200 мкг/мл). Препараты центрифугировали на Spinco L-5 при 38 000 об/мин 24 ч, ротор SW-65. Окрашенную полосу растительной ДНК отбирали и 5-кратной экстракцией изопропанолом удаляли бромистый этидий. Раствор ДНК диализировали против буферного раствора (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) и использовали в работе.

**Рестрикция и лигирование.** Рестриктию ДНК проводили в присутствии рестрикционных эндонуклеаз *EcoRI* и *VamHI*, полученных из НПО «Фермент» (Вильнюс), при 37 °С в буфере (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl). Лигирование осуществляли в присутствии Т4-ДНК-лигазы, которая была получена из НПО «Биолар» (Олайне), при 8 °С 24 ч в буфере (50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотрентол, 0,1 мМ АТФ).

**Электрофорез.** ДНК разделяли в течение 4 ч в 0,8 %-ном агарозном геле при напряженности электрического поля в 4 В/см. Электродный трис-боратный буфер (рН 8,1—8,5) содержит: 89 мМ трис-НСl, 39 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,5 мМ ЭДТА.

**Результаты и обсуждение.** Для клонирования фрагментов кукурузной ДНК, обеспечивающих автономную репликацию в дрожжах, необходим вектор, не содержащий дрожжевого участка начала репликации. Химерная дрожжевая плазида *pYF92* (рис. 1) имеет участок начала репликации в составе дрожжевой 2 мк ДНК, встроеной в

плазмиду по *EcoRI*-сайту. ДНК плазмиды *pYF92* обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI* и полученные фрагменты ДНК (молекулярная масса  $3,75 \cdot 10^6$ ;  $2,4 \cdot 10^6$ ;  $1,5 \cdot 10^6$ ) разделяли в 0,8 %-ном агарозном геле. Фрагмент  $3,75 \cdot 10^6$  элюировали, ДНК пересаждали этанолом и сшивали с помощью Т4-ДНК-лигазы. Лигированной смесью трансформировали *E. coli* HB101, и на среде с ампициллином (20 мкг/мл) отбирали клоны, содержащие рекомбинантные молекулы, которые после соответствующей проверки мы назвали *pYF40* (рис. 2). Рестрикционный анализ плазмид *pYF92* и *pYF40* представлен на рис. 3. *EcoRI*-фрагмент плазмиды *pYF92* с молекулярной массой  $3,75 \cdot 10^6$  (9-я дорожка) по электрофоретической подвижности соответствует обработанной *EcoRI* плазмиде *pYF40* (6-я дорожка). Идентичны также подвижности *BamHI*-фрагментов плазмид *pYF92* и *pYF40*, которые соответствуют гену, кодирующему синтез гистидина (8-я и 5-я дорожки). В системе *E. coli* эти плазмиды детерминируют устойчивость к ампициллину, что позволяет вести селективный отбор и нарабатывать их в препаративных количествах. Единственное отличие плазмиды *pYF40*

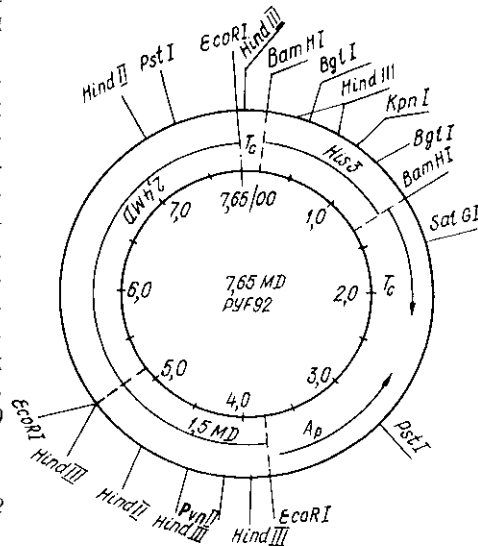


Рис. 1. Физическая карта плазмиды *pYF92*  
Fig. 1. Physical map of plasmid *pYF92*

от плазмиды *pYF92* состоит в том, что она уже не содержит дрожжевой 2 мк ДНК и может трансформировать дрожжи лишь с очень низкой частотой за счет интеграции в геном. Частота трансформации в различных опытах для плазмиды *pYF92* составляла в среднем  $(5-6) \cdot 10^3$  трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК, а для плазмиды *pYF40* — 3—6 трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК. Эта особенность и позволила использовать плазмиду *pYF40* для клонирования фрагментов кукурузной ДНК, обеспечивающих автономную репликацию в дрожжах.

Для этого кукурузную ДНК и ДНК плазмиды *pYF40* обрабатывали рестриктазой *EcoRI*. 2 мкг *EcoRI*-фрагментов кукурузной ДНК смешивали с 0,4 мкг расщепления *EcoRI* ДНК плазмиды *pYF40*, инкубировали с Т4-ДНК-лигазой и этой смесью трансформировали *E. coli* HB101. Клетки пассировали в жидкой среде с ампициллином (50 мкг/мл) и выделяли суммарный препарат плазмидной ДНК, который представлял собой исходную плазмиду *pYF40* и плазмиды с различными вставками растительной ДНК. Поскольку клонирование проводили по *EcoRI*-сайту, а в плазмиде *pYF40* нет специального селективного маркера с этим сайтом для отбора в *E. coli* только рекомбинантных плазмид с растительными вставками, то основную часть ДНК из суммарного препарата плазмид составляла исходная плазмиды *pYF40*. Для оценки величины выхода плазмид со вставками проведено клонирование при аналогичных условиях *EcoRI*-фрагментов ДНК генома кукурузы в составе бактериального вектора *pBR325*. Оценку количества рекомбинантных молекул вели по потере устойчивости к хлорамфениколу. Было получено около 5 % клонов от общего числа выросших, которые содержали какие-либо вставки. Поскольку клонирование *EcoRI*-фрагментов кукурузной ДНК в составе плазмиды *pYF40* вели при аналогичных условиях, то процент рекомбинантных плазмид на

основе *pYF40* мы приняли близким к пяти (по отношению к исходной *pYF40*). Различными количествами суммарного препарата плазмидной ДНК со вставками трансформировали компетентные клетки *S. cerevisiae*. Результаты трансформации представлены в табл. 1.

Суммарный препарат плазмидной ДНК с растительными вставками трансформирует дрожжи с частотой на порядок выше, чем исходная плаزمида *pYF40*, которая составляет приблизительно 95 % общего

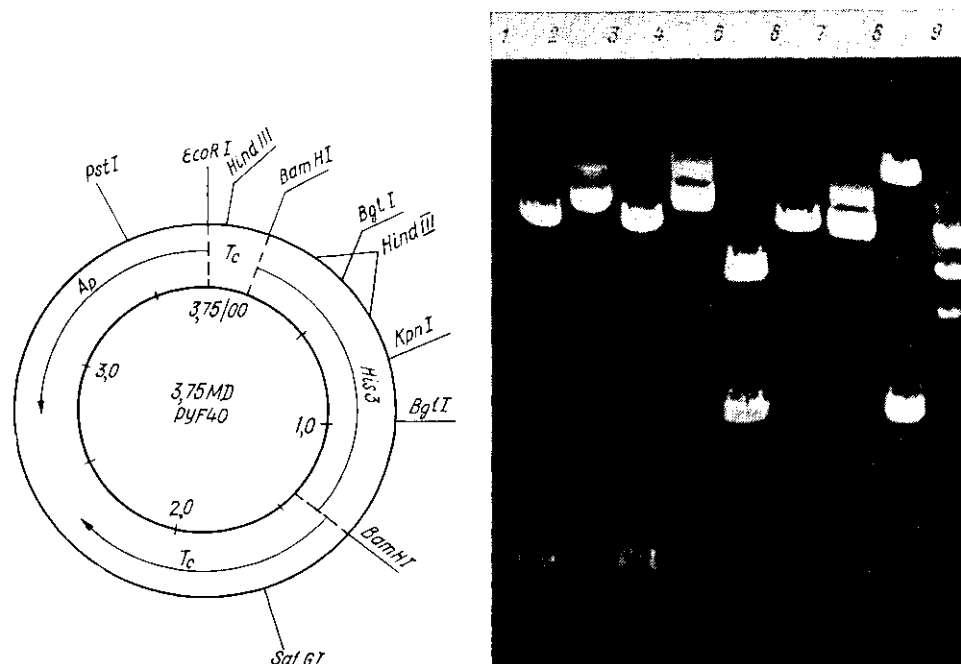


Рис. 2. Физическая карта плазмиды *pYF40*

Fig. 2. Physical map of plasmid *pYF40*

Рис. 3. Рестрикция ДНК плазмид: 1 — *pYF402*, обработанной *EcoRI*; 2 — *pYF402*; 3 — *pYF401*, обработанной *EcoRI*; 4 — *pYF401*; 5 — *pYF40*, обработанной *BamHI*; 6 — *pYF40*, обработанной *EcoRI*; 7 — *pYF40*; 8 — *pYF92*, обработанной *BamHI*; 9 — *pYF92*, обработанной *EcoRI*

Fig. 3. Restriction of plasmid DNA: 1 — *pYF402* treated with *EcoRI*; 2 — plasmid *pYF402*; 3 — *pYF401* treated with *EcoRI*; 4 — plasmid *pYF401*; 5 — *pYF40* treated with *BamHI*; 6 — *pYF40* treated with *EcoRI*; 7 — plasmid *pYF40*; 8 — *pYF92* treated with *BamHI*; 9 — *pYF92* treated with *EcoRI*

количества ДНК суммарного препарата. Это свидетельствует о том, что некоторые из *EcoRI*-фрагментов кукурузной ДНК реплицируются в дрожжах. После 15 пассажей на селективной среде из 150 отобранных первоначально клонов осталось 48. В остальных, по-видимому, произошло выщепление из плазмиды чужеродных фрагментов ДНК или элиминация клеток, содержащих рекомбинантные молекулы, и они перестали расти на селективной среде.

В дальнейшем проводили анализ трансформантов из числа тех 48 клонов, которые росли на селективной среде. Для этого дрожжевые клетки отдельного клона подращивали в жидкой среде до плотности  $10^9$  клеток в 1 мл среды, обрабатывали препаратом желудочного сока улитки до образования протопластов и проводили щелочное выделение плазмидной ДНК, которой трансформировали *E. coli*. Плазмидную ДНК из клеток отдельного дрожжевого клона нарабатывали в препаративных количествах и использовали для рестрикции и трансформации в дрожжевые клетки *S. cerevisiae*. Данные анализа части материала позволили обнаружить два клона, плазмидная ДНК которых с высокой частотой трансформирует дрожжи. Условно эти плазмиды обозначили, как *pYF401* и *pYF402*. Данные по их трансформирующей

активности представлены в табл. 2. Результаты рестрикционного анализа плазмид *pYF401* и *pYF402* приведены на рис. 3.

Вставки в плаزمидах *pYF401* и *pYF402* практически не различаются по размерам. Их молекулярная масса по электрофоретической подвижности около 800000. Если частоту трансформации дрожжей рассматривать как показатель эффективности автономно реплицирующихся последовательностей, то для плазмиды *pYF401* он в три раза выше, чем для плазмиды *pYF402*, что свидетельствует о неидентичности *ori*, несмотря на совпадающие размеры. Таким образом, разработаны условия и клонированы некоторые фрагменты кукурузной ДНК, которые автономно реплицируются в дрожжах и два из них частично охарактеризованы.

Таблица 1

Результаты трансформации *S. cerevisiae* различными количествами плазмидной ДНК  
Transformation of *S. cerevisiae* by various amounts of plasmid DNA

Плазмиды	Количество ДНК, мкг		
	5	10	20
<i>pYF 92</i>	$2,3 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^3$
<i>pYF 40</i>	2	5	9
Рекомбинантные, содержащие вставки чужеродной ДНК	15	44	91

Примечание. Цифры обозначают общее количество выросших трансформантов для каждого количества взятой ДНК.

Таблица 2

Результаты трансформации дрожжевого штамма *S. cerevisiae* различными плазмидами  
Transformation of yeast strain *S. cerevisiae* by various plasmids

Плазмиды	Число трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК	Наличие вставки
<i>pYF 92</i>	$4,5 \cdot 10^3$	—
<i>pYF 40</i>	6	—
<i>pYF 401</i>	$3,1 \cdot 10^3$	+
<i>pYF 402</i>	$1,1 \cdot 10^3$	+

Проведенное клонирование фрагментов ДНК генома кукурузы, функционирующих как ARS-последовательности в дрожжах, позволяет при определенных допущениях определить количественные характеристики этого процесса.

Из табл. 1 видно, что для трансформации *S. cerevisiae* брали 35 мкг суммарного препарата плазмидной ДНК, из которых приблизительно 5% (1,75 мкг) — плазмидная ДНК, содержащая вставки чужеродной ДНК. Это количество плазмидной ДНК после трансформации в дрожжи дало 48 клонов, стабильно пассирующихся на селективной среде. Проведенный анализ показывает, что два из них могут трансформировать дрожжи с достаточно высокой частотой. В пересчете на 10 мкг плазмидной ДНК со вставками это составляет приблизительно 11 клонов.

Для упрощения расчетов в первом приближении примем частоту трансформации в *S. cerevisiae* для плазмид с растительными вставками соизмеримой с частотой трансформации для дрожжевой плазмиды *pYF92*, величина которой в нашем опыте составила приблизительно  $4,5 \cdot 10^3$  клонов на 10 мкг плазмидной ДНК. Тогда из вышеизложенного следует, что количество автономно реплицирующихся в дрожжах *EcoRI*-последовательностей ДНК генома кукурузы в нашем опыте составляет приблизительно 0,25% общего числа клонированных *EcoRI*-фрагментов.

Предполагается использовать клонированные ARS-последовательности для изучения возможности репликации гибридных плазмид в системе растительных протопластов. На этом этапе планируется проведение гибридизации для строгого доказательства принадлежности клонированных вставок к геному кукурузы.

CLONING OF THE ZEA MAIZE GENOME DNA SEQUENCES CAPABLE OF AUTONOMOUS REPLICATION IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

V. N. Shulzhenko, V. A. Kordyum

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

Summary

DNA fragments of maize genome functioning as autonomously replicating sequences (ARS) in yeast were inserted into *EcoRI*-site of plasmid *pYF40* bearing the *His3* marker of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Two plasmids with inserts were selected which transformed strain *His<sup>-</sup> S. cerevisiae LL20(leu2-3leu2-11his3-11his3-15)* into *His<sup>+</sup>* with a frequency of  $(1-3) \cdot 10^2$  transformants per 1  $\mu$ g of plasmid DNA. ARS-plasmids are located in yeast cells in a nonintegrated form, that is confirmed by the isolation of plasmid DNA from them, with which both *E. coli* and *S. cerevisiae* cells are transformed. Size of cloned *EcoRI* DNA fragments is about 0.8 MD.

1. Gorman J. A., Dove W. F., Warren N. Isolation of physarium DNA segments that support autonomous replication in yeast // Mol. and Gen. Genet.—1981.—183, N 2.— P. 306—313.
2. Loppes R., Claude D. Chloroplast and nuclear DNA fragments from *Chlamydomonas* promoting high frequency transformation of yeast // Curr. Genet.—1983.—7, N 6.— P. 473—480.
3. Characterization of human chromosomal DNA sequences which replicate autonomously in *Saccharomyces cerevisiae* / J. F. Montiel, C. J. Norbury, M. F. Tuite et al. // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 2.— P. 1049—1068.
4. Isolation and characterization of sequences from mouse chromosomal DNA with ARS function in yeasts / G. E. Roth, H. M. Blanton, L. F. Hager, V. A. Zakian // Mol. and Cell. Biol.—1983.—3, N 11.— P. 1898—1908.
5. Skatrud P. L., Qucencer S. W. Cloning of DNA fragment from *Cephalosporium acremonium* which functions as an autonomous replication sequence in yeast // Curr. Genet.—1984.—8, N 3.— P. 155—163.
6. Molecular cloning of tobacco chromosomal and chloroplast DNA segments capable of replication in yeast / U. Hirofumi, O. Takeshi, O. Toshifumi et al. // Mol. and Gen. Genet.—1983.—192, N 1—2.— P. 1—4.
7. Chimeric plasmids for cloning of deoxyribonucleic acid sequences in *Saccharomyces cerevisiae* / R. K. Storms, J. B. McNeil, P. S. Knaudekar et al. // J. Bacteriol.—1979.— N 1.— P. 73—82.
8. Clewell D. B., Helinski D. R. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*. Purification and induced conversion to an open circular DNA form // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1969.—62, N 6.— P. 1159—1166.
9. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.—1979.—7, N 6.— P. 1513.
10. Мирошниченко Г. П., Дьяченко А. Ф. Современные методы выделения ДНК из высших растений // Успехи соврем. биологии.—1981.—91, № 1.— С. 49—60.

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

Получено 21.01.86

УДК 547.963.3

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТА  
ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ИЗОАКЦЕПТОРНОЙ тРНК<sub>СЕР</sub>  
ИЗ ПЕЧЕНИ БЫКА**

**Л. Г. Калачнюк, Л. А. Козак, М. А. Тукало, Г. Х. Мацука**

Структурно-функциональные исследования тРНК из эукариотических организмов связаны с трудностью получения в достаточных количествах гомогенного полинуклеотидного материала. Обычно для очистки изоакцепторных тРНК животных приходится использовать многостадийные схемы очистки, что в результате приводит к низкому выходу индивидуальных препаратов [1].

В настоящей работе выделение индивидуальной изоакцепторной тРНК<sub>СЕР</sub> печени быка, имеющей длинную переменную петлю, проведено всего в две стадии с высоким выходом.