

А. И. Заяц, И. Н. Стехин, Н. В. Путилина, Б. А. Левенко

## КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К ГЕРБИЦИДУ БИАЛАФОСУ

Ген, определяющий устойчивость к гербициду биалафосу (*bar*), клонирован из геномной ДНК *Streptomyces hygrosopicus*. Ген *bar* затем был клонирован в *Escherichia coli* с помощью вектора *pUC19*. Получены рекомбинантные клоны, устойчивые к биалафосу в концентрации 0,005 мг/мл. Плазмидная ДНК, выделенная из рекомбинантных клонов, содержала один и тот же *Pst*I-фрагмент размером 1,7 тыс. п. н. Проведено рестрикционное картирование этого фрагмента.

**Введение.** Применение гербицидов в сельскохозяйственном производстве в настоящее время неизбежно [1]. Они позволяют экономично контролировать количество сорняков и существенно повышать урожайность [2]. Особый интерес представляют гербициды нового поколения, обладающие высокой эффективностью и в то же время безвредные для животных и человека. Их экологическая безопасность обусловлена низкой токсичностью и быстрой биодegradацией в почве [1, 3].

К такому типу гербицидов относится биалафос. Биалафос представляет собой трипептид, действующим началом которого является фосфинотрицин (PPT) — токсичный аналог глютаминовой кислоты. Мишенью фосфинотрицина служит ключевой фермент азотного обмена — глютаминсинтетаза [3, 4], играющий центральную роль в ассимиляции аммония и в регуляции метаболизма азота в растительных клетках. Ингибирование глютаминсинтетазы PPT способствует быстрому накоплению аммония, что приводит к гибели растительной клетки. Ген *bar*, определяющий устойчивость к биалафосу, кодирует фосфинотрицинацетилтрансферазу (PAT), которая модифицирует биалафос и таким образом предотвращает гибель организма.

Однако биалафос, как и другие представители класса гербицидов нового поколения, имеет низкую специфичность действия. Это ограничивает их использование в сельскохозяйственном производстве, в основном они применяются для предпосевной обработки почвы. Создание гербицидоустойчивых сортов растений возможно методами геной инженерии, а также введением в состав растительного генома гена или генов, определяющих устойчивость к определенному гербициду [5]. Источником таких генов могут служить различные прокариоты. Так, гены устойчивости к гербициду биалафосу представлены в геноме биалафоспродуцирующих стрептомицетов и определяют их собственную устойчивость к синтезируемому гербициду.

В настоящей работе мы сообщаем о клонировании и изучении гена, определяющего устойчивость к гербициду биалафосу.

**Материалы и методы.** Используемый в работе штамм *Streptomyces hygrosopicus* устойчив на минимальной среде к биалафосу в концентрации 0,1 мг/мл. Геномную ДНК из штамма *S. hygrosopicus* выделяли по методу, описанному в работе [6]. Вектором служила плазида *pUC19* [7]. Для трансформации использовали штамм *Escherichia coli* JM101. *S. hygrosopicus* выращивали на среде YEME [6], *E. coli* — на среде LB [8].

© А. И. ЗАЯЦ, И. Н. СТЕХИН, Н. В. ПУТИЛИНА, Б. А. ЛЕВЕНКО, 1994

Щелочное выделение плазмидной ДНК, рестрикцию и электрофорез ДНК, элюцию ДНК из геля и ее очистку, бактериальную трансформацию проводили общеизвестными методами [8, 9]. Использованные в работе ферменты получены в НПК «Биотех» (Москва).

Фрагменты ДНК переносили на нитроцеллюлозные фильтры по Саузерну [10]. Метку [ $^{32}\text{P}$ ]дезоксид-АТФ в препараты ДНК вводили методом ник-трансляции [11]. В качестве зонда применяли *Pst*I-фрагмент геномной ДНК *S. hygrosopicus*, несущий ген устойчивости к биалафосу. ДНК-ДНК-гибридизацию осуществляли в течение 24 ч при

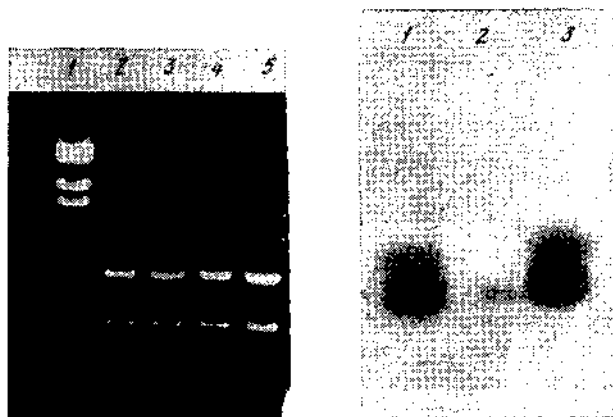


Рис. 1. Рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид: 1 — маркер (ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованная рестриктазой *Hind*III); 2—5 — плазмиды из биалафосустойчивых клонов, гидролизованные рестриктазой *Pst*I

Рис. 2. Саузерн-блот-анализ геномной ДНК *S. hygrosopicus*: 1 — плазида *pBA1*, гидролизованная рестриктазой *Pst*I; 2 — геномная ДНК *S. hygrosopicus*, гидролизованная рестриктазой *Pst*I; 3 — фрагмент геномной ДНК *S. hygrosopicus* (1,7 тыс. п. н.)

68 °С по стандартной методике [8], автордиографию для идентификации специфических фрагментов — после гибридизации в течение 2—5 дней при —70 °С с использованием усиливающего экрана.

**Результаты и обсуждение.** Проводили скрининг ряда штаммов стрептомицетов на устойчивость к гербициду биалафосу. Отбор осуществляли на минимальных средах, содержащих биалафос в различных концентрациях. Отобран штам *S. hygrosopicus*, устойчивый к биалафосу в концентрации до 0,1 мг/мл.

Для клонирования гена *bar*, определяющего устойчивость к биалафосу у *S. hygrosopicus*, был создан банк генов данного штамма. Клонирование проводили в векторе *pUC19* в штамме *E. coli* JM101. Геномную ДНК штамма *S. hygrosopicus* расщепляли рестриктазой *Pst*I и осуществляли электрофорез в 0,7 %-м агарозном геле. Затем элюировали из геля фрагменты ДНК размером 1,5—2,5 тыс. п. н. и лигировали их с плазмидой *pUC19*, гидролизованной рестриктазой *Pst*I. Полученным препаратом ДНК трансформировали штамм *E. coli* JM101. Рекомбинантные клоны отбирали после посева клеток на среду LB, содержащую ампициллин, X-gal и изопропилтиогаалактозид (IPTG). Далее рекомбинантные клоны переносили с помощью реплик на минимальную среду с биалафосом в концентрации от 1 до 10 мкг/мл и 0,1 мМ IPTG.

ДНК, встроенная в полилинкерную область *pUC19*, способна транскрибироваться под *lac*-промотором вектора. В штамме JM101 транскрипция с *lac*-промотора может быть индуцирована IPTG [12]. Штамм JM101 как с плазмидой *pUC19*, так и без нее слабо резистентен к биалафосу (до 0,0005 мг/мл). Уровень устойчивости не повышается и с помощью IPTG. Нами отобраны рекомбинантные клоны, устойчивые к гербициду биалафосу в концентрации до 0,005 мг/мл в присутствии 0,1 мМ IPTG.

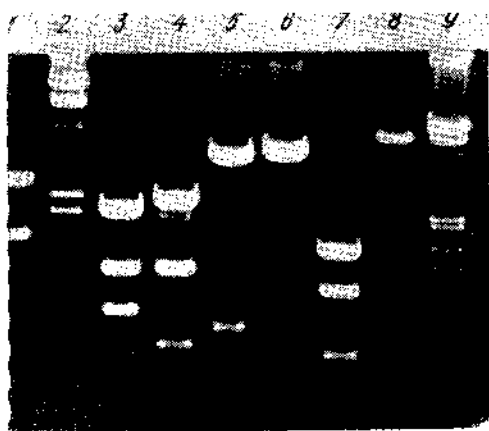


Рис. 3. Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды *pBA1*: 2 — маркер (ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованная рестриктазой *HindIII*); 1, 3 — 8 — плазмиды *pBA1*, гидролизованная рестриктазами: *PstI*, *PvuI*, *PvuII*, *SalGI*, *KpnI*, *BglI*, *BglII* соответственно; 9 — маркер (ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованная рестриктазами *HindIII* + *EcoRI*)

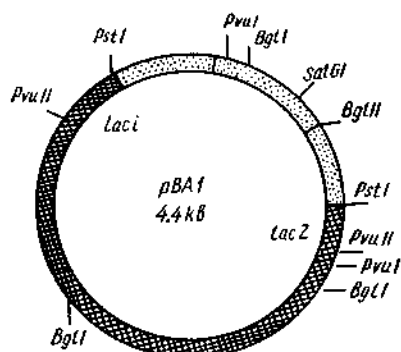


Рис. 4. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды *pBA1*, несущей устойчивость к биалафосу

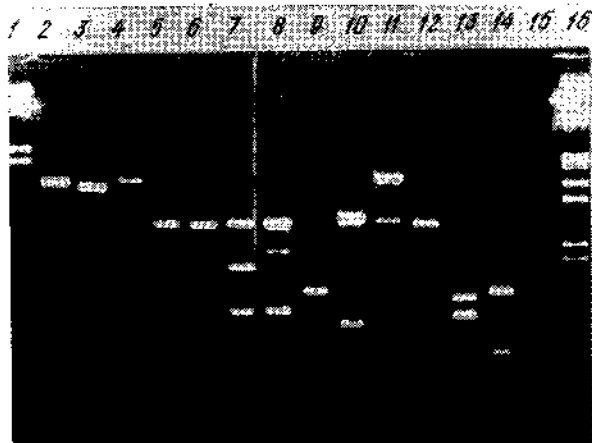


Рис. 5. Рестрикционный анализ *PstI*-фрагмента геномной ДНК *S. hygroscopicus*, несущего устойчивость к гербициду биалафосу; 1 — маркер (ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованная рестриктазой *HindIII*); 2 — *PstI*-фрагмент геномной ДНК *S. hygroscopicus*; 3 — 15 — *PstI*-фрагмент, гидролизованный рестриктазами *BamHI*, *SalGI*, *PvuI*, *PvuII*, *SalGI* + *PvuI*, *BglI*, *BglII*, *KpnI*, *KpnI* + *PvuII*, *KpnI* + *PvuI*, *Sau3A*, *BglI* + *PvuII* соответственно; 16 — маркер (ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованная рестриктазами *HindIII* + *EcoRI*)

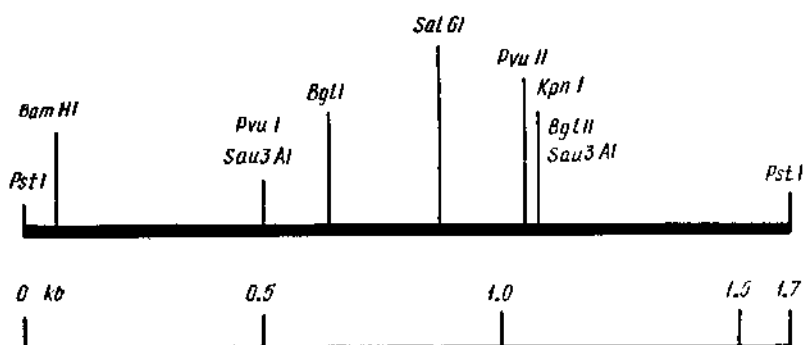


Рис. 6. Рестрикционная карта *PstI*-фрагмента геномной ДНК *S. hygroscopicus*, несущего ген устойчивости к гербициду биалафосу

Из полученных биалафосустойчивых клонов выделена плазмидная ДНК. Рестрикционный и электрофоретический анализ рекомбинантных плазмид показал, что все они содержат добавочный *PstI*-фрагмент размером 1,7 тыс. п. н. (рис. 1).

С помощью метода блоттинг-гибридизации доказано, что полученный фрагмент принадлежит геномной ДНК *S. hygroscopicus* (рис. 2).

Проведен рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды (рис. 3). Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды (*pBA1*), содержащей фрагмент геномной ДНК *S. hygroscopicus* размером 1,7 тыс. п. н., показана на рис. 4.

Далее выделяли фрагмент размером 1,7 тыс. п. н. ДНК плазмиды *pBA1* расщепляли рестриктазой *PstI*, осуществляли электрофорез в 0,8 %-й легкоплавкой агарозе и элюировали необходимый фрагмент. Проведено рестрикционное картирование полученного фрагмента ДНК с использованием ряда рестриктаз (рис. 5). Рестрикционная карта клонированного нами фрагмента ДНК *S. hygroscopicus*, содержащего ген устойчивости к гербициду биалафосу, приведена на рис. 6.

Таким образом, нами клонирован фрагмент геномной ДНК *S. hygroscopicus*, содержащий ген устойчивости к гербициду биалафосу.

Клонированный ген *bar* может быть использован для создания устойчивых к биалафосу сельскохозяйственных растений, а также как маркер для селекции трансгенных растений.

О. І. Засць, І. М. Стехін, Н. В. Путиліна, Б. О. Левенко

#### КЛОНОВАНИЕ ГЕНА СТИЙКОСТІ ДО ГЕРБІЦИДУ БІАЛАФОСУ

##### Резюме

Ген, що визначає стійкість до гербициду біалафосу (*bar*), клоновано із геномної ДНК *Streptomyces hygroscopicus*. Далі цей ген було клоновано у *Escherichia coli* за допомогою вектора *pUC19*. Одержано рекомбінантні клони, стійкі до біалафосу в концентрації 0,005 мг/мл. Плазмідна ДНК, виділена із рекомбінантних клонів, мала один і той же *PstI*-фрагмент розміром 1,7 тис. п. н. Проведено рестрикційне картування цього фрагмента.

A. I. Zayas, I. N. Stekhin, N. V. Putilina, B. A. Levenko

#### CLONING OF THE HERBICIDE BIALAPHOS RESISTANCE GENE

##### Summary

A gene which confers resistance to the herbicide bialaphos (*bar*) has been cloned from *Streptomyces hygroscopicus* genomic DNA. The *bar* gene was cloned in *E. coli* using the vector *pUC19*. The recombinant clones, resistant to bialaphos in concentration 0.005 mg/ml, were obtained. Plasmid DNA isolated from resistant clones in each case contained the same 1.7-kb *PstI* fragment. Restriction mapping of this fragment has been made.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Botterman J., Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants // TIG.—1988.—4.—P. 219—222.
2. De Greef W., Delon R., De Block M. et al. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions // Biotechnology.—1989.—7.—P. 61—65.
3. De Block M., Betterman J., Vandewiete M. et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // EMBO J.—1987.—6.—P. 2513—2518.
4. Murakami T., Anzai H., Imai S. et al. The bialaphos genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of gene cluster // Mol. and Gen. Genet.—1986.—205.—P. 42—50.

5. Piruzian E. S., Mett V. L., Kobets N. S., Urmeeva F. I. The use of bacterial genes encoding herbicide tolerance in constructing transgenic plants // *Microbiol. Sci.*—1988.—5.— P. 242—247.
6. Д. Гловер. Клонирование ДНК. Методы.— М.: Мир, 1988.— С. 267—268.
7. Yanisch O., Perron G., Viera J., Messing J. Improved M 13 of the M 13 mp 18 and pUC19 vectors // *Gene*.—1985.—33.— P. 103—119.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
9. Draper J., Scott R., Armitage P. Plant genetic transformation and gene expression.— Oxford, 1988.— P. 28—51.
10. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.*—1975.—98.— P. 503—518.
11. Rigby P. W., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I // *Ibid.*—1977.—113.— P. 237—251.
12. Thompson J., Rao N., Tizard R. et al. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* // *EMBO J.*—1987.—6.— P. 2519—2523.

Ин-т физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

Получено 02.12.93