

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⁻ S. cerevisiae LL20(leu2-3leu2-11his3-11his3-15)* into *His⁺* with a frequency of $(1-3) \cdot 10^2$ transformants per 1 μ 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., Qucener 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^{СЕР}
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^{СЕР} печени быка, имеющей длинную переменную петлю, проведено всего в две стадии с высоким выходом.

Материалы и методы. Препараты суммарной тРНК получены по методу Брунграбер [2]. Смесь аминоксил-тРНК-синтетаз (АРСаэ) выделяли из печени быка по [3].

Бензонлированную ДЭАЭ-целлюлозу (БД-целлюлозу) синтезировали по методу Тенсера [4]. Первую колонку с БД-целлюлозой готовили, как описано в [5], вторую — подобно первой, исключив ионы Mg^{2+} из всех буферных растворов.

Акцепторную активность тРНК^{сер} определяли по уровню образования ^{14}C -серил-тРНК при избытке фермента в условиях реакции аминокислотирования [1].

Исчерпывающий гидролиз тРНК₁^{сер} Т₁-РНКазой («Sankyo Co», Япония) проводили в 0,01 М трис-НСl, рН 7,5, при 20 °С, 17 ч. В пробу объемом 30 мкл вносили тРНК, Т₁-РНКазу из расчета 1 ед. активности фермента на 10 мкг тРНК.

Хроматографию олигонуклеотидов Т₁-РНКазного гидролизата проводили на микроколонок с ДЭАЭ-целлюлозой при рН 7,5 в 7 М мочевице [6] с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром».

В работе использовали следующие реактивы: ^{14}C -серин (удельная активность 4,4 ГБк/ммоль, «Сметарол», ЧССР); натриевую соль АТФ («Serva», ФРГ); $MgCl_2$, 2-меркаптоэтанол («Merck», ФРГ); NaCl осч.

Результаты и обсуждение. Выделение индивидуальной сериновой тРНК из печени быка проводили комбинацией двух хроматографий на колонках с БД-целлюлозой. На первой стадии очистки использовали хроматографию суммарной тРНК на БД-целлюлозе по [5].

При хроматографии 1 г суммарного препарата тРНК печени быка в данной системе получено три пика серин-акцепторной активности. Фракции, содержащие первый пик (80 мг), объединяли и осаждали спиртом (тРНК₁^{сер}).

40 мг тРНК₁^{сер} рехроматографировали вторично на колонке (2×30 см) с БД-целлюлозой в отсутствие ионов Mg^{2+} при 4 °С. тРНК элюировали со скоростью 55 мл/ч в градиентах концентраций 0,2—1,3 М NaCl (750 мл) и 1,3—2,0 М NaCl с градиентом этанола от 0 до 10 % (450 мл) в буфере 0,01 М NaAc, рН 4,5, 1 мМ 2-меркаптоэтанол. В пределах первого градиента протекла элюция большей части тРНК. тРНК₁^{сер}, обладающая, как и тРНК₁^{сер} из печени крыс [7], высокой гидрофобностью, элюировалась в спиртовом градиенте. В результате хроматографии получено 2 мг тРНК₁^{сер} высокой степени чистоты.

Чистоту выделенного препарата проверяли по его акцепторной активности, электрофорезе в полиакриламидном геле (8 %) в 7 М мочевице, а также по наличию примесных олигонуклеотидов в олигонуклеотидной карте Т₁-РНКазного гидролизата тРНК₁^{сер}, где найдено очень низкое количество примесных олигонуклеотидов. Это свидетельствует о высокой степени чистоты полученного препарата.

Таким образом, использованная схема очистки тРНК₁^{сер} является эффективной для препаративного выделения тРНК. При ее применении из 1 г суммарной тРНК выделили 4 мг тРНК₁^{сер} с высокой степенью чистоты, что подтверждено при расшифровке ее первичной структуры. Исходя из полученных предварительных данных, первичная структура тРНК₁^{сер} печени быка имеет высокую гомологию с тРНК₃^{сер} печени крысы [7].

ISOLATION AND CHARACTERISTIC OF THE INDIVIDUAL ISOACCEPTOR tRNA₁^{ser} PREPARATION FROM THE BOVINE LIVER

L. G. Kalachnyuk, L. A. Kozak, M. A. Tukalo, G. Kh. Matsuka

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

Summary

Two stages were applied for high yield isolation of individual isoacceptor serine tRNA₁ from the bovine liver, summing up 4 mg of tRNA₁^{ser} from 1 g of total tRNA.

1. Методы выделения суммарных тРНК и индивидуальных тРНК^{Лей} и тРНК^{Фен} из животных тканей / М. И. Коваленко, Н. И. Желтовская, А. В. Ельская и др. // Методы молекуляр. биологии.— Киев: Наук. думка, 1979.— С. 98—111.
2. Brungraber E. A. Simplified procedure for preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1962.— 8, N 1.— P. 1—3.
3. Keller E., Zamechnick P. The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on incorporation of labelled amino acids into proteins // J. Biol. Chem.— 1956.— 221, N 1.— P. 45—49.
4. The separation of soluble ribonucleic acids on benzylated DEAE-cellulose // J. Gillam, S. Millward, D. Blew et al. // Biochemistry.— 1967.— 6, N 10.— P. 3043—3048.

5. Diamond A., Dudock B. Structure and properties of a bovine liver UGA suppressor serine tRNA with a tryptophan anticodon // Cell. — 1981. — 25, N 2. — P. 497—506.
6. Тукило М. А., Васильченко И. Г., Власов В. В. Ультрамикроспектрофотометрические методы исследования первичной структуры тРНК // Методы молекуляр. биологии. — Киев: Наук. думка, 1979. — С. 111—126.
7. Rogg H., Müller P., Staechelin M. Nucleotide sequences of rat liver serine tRNA. Structure of serine tRNA₃ and partial nucleotide sequences of serine tRNA_{2a} // Eur. J. Biochem. — 1975. — 53, N 1. — P. 115—127.

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

Получено 20.02.87

УДК 577.212

ХИМЕРНЫЙ ГЕН *rpoC'-lacZ'* РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ *pUC19*, СОХРАНЯЮЩЕЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Е. Б. Патон, А. Н. Живолуп

Для изучения функциональной топографии основного фермента транскрипции *E. coli* — ДНК-зависимой РНК-полимеразы — ранее были сконструированы рекомбинантные нитевидные фаги *M13mp8* и *mWB* [1] и рекомбинантная плазмида *pUC19* [2] со встроенным *BglIII-B*-фрагментом космиды *pJC703* [3], содержащем гены *rplI*, *rplL* и *rpoB* (кодирующие рибосомные белки L10, L7/L12 и β -субъединицу РНК-полимеразы), а также участок гена *rpoC* (β' -субъединица РНК-полимеразы). Было обнаружено, что при клонировании в нитевидных векторных фагах встраивание вышеуказанного фрагмента происходит в единственной ориентации, так, что направление транскрипции с промоторов *lac* (вектора) и *P_z* (клонированного фрагмента) совпадает. При клонировании в плазмиде *pUC19* [4] также наблюдалась однонаправленная ориентация [2] встраиваемого фрагмента, но она была противоположной его ориентации в нитевидных фагах [1]. В первом и во втором случаях при отборе рекомбинантных клонов мы использовали то обстоятельство, что встраивание чужеродного фрагмента ДНК в полилинкерную область вектора нарушает структуру гена *lacZ'*. Это приводит к потере голубой окраски на индикаторной среде с ИПТГ (изопропилтиогалактозид) и X-gal (5-бромо-4-хлоро-3-индолл- β -D-галактозид) [5] клетками, содержащими рекомбинантную ДНК. Известны, однако, случаи [6, 7], когда совпадение рамки считывания гена *lacZ'* вектора и гена, содержащегося во встроеном фрагменте, может привести к образованию гибридного белка, сохраняющего способность к α -комплементации [8] и обеспечивающего активность β -галактозидазы, проявляющаяся в голубой окраске клеток *E. coli*, включающих рекомбинантную ДНК. Из анализа нуклеотидной последовательности плазмиды *pUC19* [4] и клонируемого *BglIII-B*-фрагмента [9—12] стало очевидно, что при встраивании последнего в *BamHI*-сайт полилинкерной области *pUC19* возможно слияние генов *rpoC'* и *lacZ'* с сохранением рамки считывания и образованием гибридного гена (при клонировании в нитевидных фагах *M13mp8* и *mp9* рамка считывания нарушается). Для проверки этого предположения, т. е. возможной альтернативной ориентации *BglIII-B*-фрагмента *pJC703* при конструировании [2] рекомбинантной плазмиды *pUC19*, результатом которого явилось бы образование химерного гена *rpoC'-lacZ'*, кодирующего способный к α -комплементации химерный донорный пептид β -галактозидазы, мы провели анализ полученных ранее [2] клонов *E. coli*, обладающих устойчивостью к ампициллину (кодируемой геном векторной плазмиды *pUC19*) и голубой окраской на среде, содержащей ИПТГ и Z-gal (Z-gal синтезирован в лаборатории А. Г. Терентьева, Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, и является аналогом X-gal). Учитывая, что ген *rpoB*, содержащийся в *BglIII-B*-фрагменте *pJC703* (рис. 1), несет доминантную мутацию устойчивости к рифампицину (*rif^r*) *rpoB3*, голубые клоны *E. coli*, полученные в результате трансформации компетентных клеток *E. coli* JM101 [5] лигазной смесью *BglIII*-гидролизата *pJC703* с *BamIII*-гидролизатом *pUC19*, перекальвали на среду, содержащую 100 мкг/мл рифампицина. В результате этого были отобраны 50 клонов *E. coli*, обладающих *Rif^r*-фенотипом и голубой окраской. Далее плазмидную ДНК из