



УДК 575.155:575.224.46

ИЗУЧЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛНЫЙ ГЕНОМ SV40, В ПЕРМИССИВНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С. М. Ландау, Л. К. Сасна, М. А. Шлянкевич, О. Б. Дризе

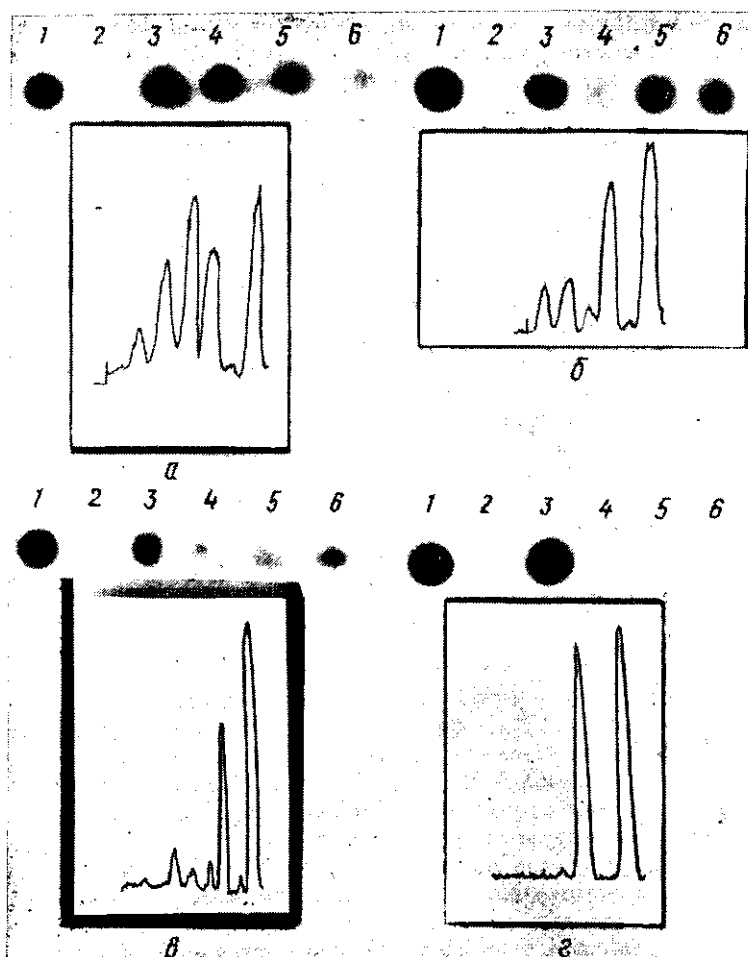
Введение. Известно, что плазмиды, содержащие геном вируса SV40, в настоящее время используют в качестве эукариотических векторов. Поэтому представляет интерес изучение репликации этих плазмид в культурах клеток млекопитающих. Ранее было показано, что плазида *pBR322* содержит «ядовитые» последовательности, препятствующие репликации рекомбинантных плазмид, содержащих геном SV40, в культурах клеток млекопитающих. После удаления этих последовательностей рекомбинантные плазмиды реплицируются в перmissive культуре клеток. В то же время трансформированные вирусом SV40 культуры обезьяньих клеток COS, экспрессирующие функционально активный T-антиген SV40, поддерживают репликацию плазмид с «ядовитыми» последовательностями [1]. Для нас представляло интерес сравнить уровень репликации бактериальных плазмид, содержащих полный геном SV40, с «ядовитыми» последовательностями и без них в перmissive культурах клеток почки африканской зеленой мартышки CV1 и COS. Были использованы две плазмиды: *pYM*, состоящая из *pBR322* и полного генома SV40 и не содержащая «ядовитых» последовательностей [1], и полученная нами плазида *pSV9* [2], состоящая из *pBR325* и двух полных геномов SV40.

В связи с тем, что плазида *pSV9*, как ранее было показано нами [2], не реплицируется в культурах клеток CV1, мы использовали вирус SV40 для индукции ее синтеза в культурах клеток. С целью изучения репликации плазмид, содержащих полный геном SV40, были исследованы следующие варианты: репликация плазмиды *pYM* в COS-клетках, репликация плазмиды *pSV9* в COS-клетках, а также в CV1-клетках в присутствии вируса SV40. В качестве контроля использовали плазмиду *pBR322*.

Материалы и методы. Монослой клеток во флаконах объемом 50 мл обрабатывали кальциевым преципитатом, содержащим 0,7—1,3 мкг плазмиды. После этого клетки культивировали в обычных условиях. Культуры клеток инфицировали вирусом SV40 либо за сутки, либо непосредственно перед введением плазмиды. Лизаты клеток, полученные по методу Хирта, снимали в динамике инфекции ежедневно в течение 3 сут, начиная с нулевой точки инфекции, т. е. сразу же после обработки кальциевым преципитатом.

Препараты ДНК, выделенные из каждой культуры клеток, наносили на две полоски нитроцеллюлозы и осуществляли дот-гибридизацию с ^{32}P -*pBR322* (10^8 имп/мкг). Используя метод автордиографии, а также спектрофотометрический метод (элюция гранул серебра из автордиограмм) [3], были построены калибровочные кривые и учтено количество нанесенной плазмидной ДНК.

Результаты и обсуждение. Нами ранее была показана динамика синтеза плазмиды *pYM* в CV1-клетках [4]. Был произведен расчет количества копий плазмиды *pYM* на инфицированную клетку. Площадь пика ДНК *pYM* ([4], рисунок б) соответствует 0,92 мкг. Из наших данных следует, что один 50 мл матрас содержит в среднем 10^5 клеток, из которых инфицируется примерно 6%. Следовательно, ориентировочно, в $6 \cdot 10^4$ клеток реплицируется *pYM*. Так как в 1 мкг ДНК *pYM* содержится 10^{11} молекул, то каждая инфицированная клетка CV1 будет содержать 10^6 копий плазмиды *pYM* ($0,92 \cdot 10^{11} = 9 \cdot 10^{10}$ молекул, $9 \cdot 10^{10} : 6 \cdot 10^4 = 10^6$ копий). Аналогичные данные были получены нами на COS-клетках. Максимальное накопление плазмиды *pYM* составило 0,68 мкг и примерно 10^6 копий на клетку. Как известно из литературы [5], в инфици-



Исследование репликации бактериальных плазмид, содержащих геном *SV40*, в культурах перmissive клеток *CV1* и *COS* (последовательность пятен слева направо, а пиков соответствующих автордиограмм — справа налево; пятна 1—6 соответствуют 0,4 мкг *pBR322*, контролю клеток, нулевой точке инфекции, 1-м сут; 2-м сут; 3-м сут): *a, б* — репликация *pSV9* в *COS*-клетках в присутствии вируса *SV40* и в его отсутствие соответственно; *в* — репликация *pSV9* в *CV1*-клетках в присутствии вируса *SV40*, введенного за сутки до трансфекции плазмидой; *г* — репликация *pBR322* в *CV1*-клетках в присутствии вируса *SV40*

Studies in replication of bacterial plasmids containing a *SV40* genome in permissive lines of *CV1* and *COS* cells (order of spots from left to right and of peaks of corresponding autoradiograms from right to left; spots 1-6 correspond to 0.4 μ g of *pBR322*, cell control, zero point of infection, 24, 48 and 72 h after post-transfection, respectively): *a, б* — replication of *pSV9* in *COS* cells in the presence of *SV40* and its absence, respectively; *в* — replication of *pSV9* in *CV1* cells in the presence of *SV40* injected 24 h before transfection with plasmid; *г* — replication of *pBR322* in *CV1* cells in the presence of *SV40*

рованной вирусом *SV40* клетке содержится 10^6 копий ДНК *SV40*. Таким образом, можно сделать вывод о том, что рекомбинантные плазмиды, содержащие полный геном *SV40*, в отсутствие «ядовитых» последовательностей реплицируются так же, как и вирус *SV40*. Эти наши данные совпадают с результатами других авторов [1]. Следовательно, даже наличие дополнительного *T*-антигена в *COS*-клетках не влияет на уровень синтеза плазмиды *pYM*. По-видимому, 10^6 копий плазмиды на клетку является максимальным количеством.

Уровень репликации плазмиды *pSV9* в *COS*-клетках значительно ниже, чем плазмиды *pYM* (рисунок, б). Максимальный уровень синтеза *pSV9* наблюдается на 2-е и 3-е сут, достигая всего лишь 0,2 мкг. Однако при одновременном введении вируса *SV40* и плазмиды *pSV9* в *COS*-клетки уровень синтеза плазмидной ДНК значительно возрастает (рисунок, а). Максимальное количество плазмидной ДНК выявляется через сут-

ки и достигает 0,8 мкг, т. е. почти так же, как *pYM* в *CV1*- и *COS*-клетках. Таким образом, добавление вируса *SV40* индуцирует репликацию плазмидной ДНК практически до уровня репликации собственной ДНК. Однако, так как молекулярная масса *pSV9* примерно в 1,5 раза больше, чем плазмиды *pYM*, количество копий на инфицированную клетку составляет в среднем $5 \cdot 10^5$. Плазмида *pBR322*, используемая в качестве контрольной, не реплицируется ни в *COS*-клетках, ни в *CV1*-клетках при одновременном введении с вирусом *SV40* (рисунок, *г*).

В то же время, если вирусом *SV40* инфицировать клетки *CV1* за сутки до введения плазмиды, наблюдается низкий уровень репликации плазмидной ДНК (рисунок, *в*). Максимальное ее количество обнаруживается на 3-и сут и составляет примерно 0,26 мкг. Эти результаты аналогичны данным, полученным при изучении уровня репликации *pSV9* в *COS*-клетках (0,2 мкг; рисунок, *б*).

Таким образом, по-видимому, в каждой инфицированной вирусом *SV40* клетке синтезируется избыток *T*-антигена, достаточный для репликации плазмидной ДНК до уровня репликации вирусной ДНК. И, как видно из представленных данных, «ядовитые» последовательности в этих условиях практически не влияют на уровень репликации плазмидной ДНК. Наше предположение заключается в том, что «ядовитые» последовательности могут влиять лишь на синтез собственного функционально активного *T*-антигена рекомбинантной плазмиды. Синтезированный *T*-антиген вируса *SV40* связывается с регуляторным эукариотическим районом рекомбинантной плазмиды, индуцируя ее репликацию до уровня репликации вирусной ДНК. Таким образом, «ядовитые» последовательности не влияют на связывание трансактивированного *T*-антигена с рекомбинантной плазмидой.

Можно предположить также, что функциональная активность *T*-антигена в клетках через сутки после инфицирования вирусом *SV40* значительно снижается и поэтому репликация плазмидной ДНК идет на более низком уровне. По-видимому, также и функциональная активность *T*-антигена в *COS*-клетках значительно ниже таковой *T*-антигена инфекционного вируса *SV40*. Кроме того, как известно, значительное число сконструированных ранее рекомбинантных плазмид содержит «ядовитые» последовательности и, следовательно, не могут реплицироваться в *CV1*-клетках. Используя вирус *SV40*, можно индуцировать максимальный уровень репликации этих плазмид и подобрать оптимальные условия для экспрессии генов, входящих в их состав.

Выводы. 1. При одновременном введении вируса *SV40* и плазмид, содержащих «ядовитые» последовательности и геном *SV40*, репликация ДНК плазмид достигает максимального уровня (10^6 копий на инфицированную клетку).

2. При введении рекомбинантных плазмид, содержащих «ядовитые» последовательности, через сутки после инфицирования вирусом *SV40* уровень репликации плазмид снижается в несколько раз и примерно соответствует уровню их репликации в *COS*-клетках.

Авторы благодарят сотрудника ИМБГ АН УССР А. Петренко за помощь при получении пнк-транслированной ^{32}P -*pBR322* и постановке реакции дот-гибридизации.

STUDIES IN REPLICATION OF PLASMIDS CONTAINING A COMPLETE *SV40* GENOME IN PERMISSIVE MAMMALIAN CELLS

S. M. Landau, L. K. Sasina, M. A. Shlyankevich, O. B. Dreeze

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Research Institute of Carcinogenesis, All-Union Cancer Research Center,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Summary

After simultaneous infection of permissive cells with *SV40* and transfection with plasmids containing the *SV40* genome and «poison sequences», replication of plasmids reaches the maximum level (10^6 copies per infected cell). When the plasmids are transfected 24 h after post-infection of cells with *SV40*, the replication level decreases several times and approximately corresponds to the level of their replication in *COS* cells.

1. Luský M., Botchan M. Inhibition of SV40 replication in simian cells by pBR322 DNA sequences // Nature.— 1981.— 293.— P. 79—81.
2. Сасина Л. К., Ландау С. М., Кордюм В. А. Конструирование и анализ двурепликонных гибридных плазмид, содержащих геном обезьяньего паповавируса SV40 // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1986.— № 1.— С. 26—30.
3. Suissa M. Spectrophotometric quantitation of silver grains eluted from autoradiograms // Anal. Biochem.— 1983.— N 133.— P. 511—514.
4. Исследование репликации плазмид, содержащих геном SV40, в клетках млекопитающих / С. М. Ландау, Л. К. Сасина, Н. А. Чашин, Л. И. Чашина // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 3.— С. 134—136.
5. Persistence of freely replicating SV40 recombinant molecules carrying a selectable marker in permissive simian cells / L. C. Tsui, M. L. Breitman, L. Siminovitch, M. Buchwald // Cell.— 1982.— 30, N 3.— P. 499—508.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
НИИ канцерогенеза Всесоюз. онкол.
науч. центра АМН СССР, Москва

Получено 26.02.88

УДК 579.262

АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ КОЛОНИЗИРУЮТ КСИЛЕМУ КОРНЯ РИСА

Т. Н. Х. Нгуен, Т. Н. Б. Тон, В. А. Тарасенко, Н. А. Козыровская

До недавнего времени внутритканевая локализация азотфиксирующих бактерий, ассоциированных с растением, была строго доказана лишь для представителей рода *Azospirillum* [1, 2]. В ряде публикаций сообщалось о выделении азотфиксирующих бактерий (отличающихся по свойствам от азоспирилл) преимущественно из дикорастущих трав—пионеров в освоении новых ареалов [3—5]. Однако доказательством наличия бактерий во внутренних тканях растения являлась лишь техника выделения бактерий из простерилизованных корней. Недавно группа западно-германских исследователей, применив метод иммунофлюоресценции, впервые показала наличие палочковидных бактерий в аэренхиме корней *Leptochloa fusca* [6]. Нами выделены бактерии с азотфиксирующей активностью из культурного растения — риса — и показана их локализация внутри ткани растения с помощью электронно-микроскопического анализа.

Образцы растений риса были собраны на чеках северного Вьетнама. Корни риса отделяли и стерилизовали 1 %-ным раствором хлорамина *b*. Бактерии изолировали традиционным способом, отбирая фракцию гистоплана для инокуляции на полноценную питательную среду.

Выделенные бактерии VN-1, VN-2, VN-3 представляют собой грамотрицательные палочки, различающиеся по свойствам между собой и несходные с азоспириллами (рисунок, *a* — *b*). На полужидком агаре со стартовой дозой азота в микроаэрофильных условиях бактерии VN-3 проявляли азотфиксирующую активность, определяемую по восстановлению бактериями ацетилена до этилена. В газовой фазе флаконов, содержащих клетки этих бактерий, обнаруживали до 1 % этилена по объему через 18 ч после введения во флаконы ацетилена (10 %). Бактерии VN-1 проявляли в условиях дефицита азота очень низкую ацетиленредуктазную активность, вероятно, не связанную с процессом фиксации азота.

В условиях стерильного микровегетационного опыта проведена инокуляция зерновок риса (сорт JR-6A) смесью культур изолированных бактерий (1 : 1 : 1). Бактерии VN-2 и VN-3 маркированы признаками устойчивости к рифампицину и налидиксовой кислоте (соответственно); VN-1 (*Rif^r*) отличается способностью образовывать характерный пигмент. Зерновки риса стерилизовали, как описано выше. Контролями служили неинокулированные зерновки и зерновки, инокулированные лабораторным штаммом *E. coli* HB101. После недельной инкубации проростков риса с исследуемыми бактериями на агаре, не содержащем источников углерода и азота [8], ацетиленредуктазная активность ассоциации рис — бактерии составляла 125 ± 11 нмоль C_2H_4 на флакон объемом 30 мл через сутки после введения ацетилена.

Для электронно-микроскопического анализа инфицированных корней риса сегменты корня длиной 4—5 мм фиксировали 2,5 %-ным глутаральдегидом в 0,1 М каоди-