

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИНЦИПА ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ
ОКАЯМЫ — БЕРГА ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ кДНК ЯЧМЕНЯ**

Л. Ф. Дьяченко, Ю. М. Сиволап

Успехи селекции сельскохозяйственных растений в значительной мере зависят от генетического разнообразия исходного материала, получаемого, в основном, в результате половой гибридизации и мутагенеза. Эти традиционные методы селекции не могут создать принципиально новые комбинации наследственной информации из-за барьеров межвидовой изоляции. Успешное их преодоление возможно с применением методов генетической инженерии растений, одним из основных элементов которых является выделение и последующее клонирование отдельных генов. В этой связи особое значение приобретает клонирование генов, кодирующих запасные белки важнейших сельскохозяйственных растений, так как позволит изучить их количество и характер распределения в геноме, выяснить генетические основы их гетерогенности, разработать селекционные программы улучшения качества белка и проводить адресованный мутагенез на выделенных генах.

В настоящее время наиболее распространенным методом получения генов является ферментативный синтез двунитовой кДНК на поли(А)+мРНК с последующим клонированием ее в бактериальной плазмиде [1, 2].

Большие затруднения при такой технике клонирования кДНК вызывает получение рекомбинантов с полноразмерной кДНК, т. е. с полной нуклеотидной последовательностью РНК-матрицы [3, 4]. В большинстве экспериментов основная масса кДНК-клонов содержит 3'-нетранслируемую последовательность и последовательности различной длины, кодирующие белок [5, 6]. Причина неудачи чаще всего кроется в этапе синтеза второй цепи кДНК, который экспериментатор практически не может контролировать. На этой стадии праймером служит шпильчатая структура, образующаяся на 3'-конце одонитовой кДНК, причем ее размеры и локализация непредсказуемы [7]. Последующий гидролиз одонитовой петли нуклеазой *S1* приводит к исчезновению той части ДНК, которая соответствует начальной последовательности аминокислот в белке. По этой причине для отбора полноразмерных копий используют различные методические приемы, как, например, фракционирование кДНК по размеру [8—10]. Иногда в качестве праймера для синтеза второй цепи применяют специально синтезированные комплементарные последовательности [11, 12]. При этом удается избежать *S1*-нуклеазной обработки и получить кДНК с интактной 5'-концевой нуклеотидной последовательностью.

Принципиально новый метод получения полноразмерных молекул кДНК был разработан Окаямой и Бергом [13]. Предложенная ими высокоэффективная техника клонирования имеет следующие преимущества: векторная ДНК одновременно служит праймером для синтеза первой и второй цепей кДНК; не требуется обработки *S1*-нуклеазой; предпочтительно получают рекомбинанты с полноразмерной длиной кДНК.

Внеся некоторые модификации, мы использовали предложенный авторами подход в работе по клонированию кДНК, синтезированной на поли(А)+мРНК из эндоспермов ячменя.

Успешное клонирование генов, в первую очередь, зависит от наличия нативного препарата мРНК. Наиболее удобным для выделения РНК из эндоспермов ячменя оказался метод с применением хлористого лития [14, 15]. Выход РНК составляет 6—7 мг из 5 г эндоспермов, а электрофоретическое разделение в 2%-м геле агарозы свидетельствует о нативности выделенного препарата, судя по положению зон 25S и 18S рибосомальных РНК (рис. 1). Поли(А)+мРНК из тотальной

РНК эндоспермов выделяли путем двукратной хроматографии на олиго(dT)-целлюлозе. Как видно из рис. 2, полученная мРНК является высокомолекулярной; основное ее количество располагается в геле выше 9S глобиновой мРНК, что согласуется с литературными данными о размерах гордеиновых мРНК — 11-17S [16, 17]. Выделенная мРНК

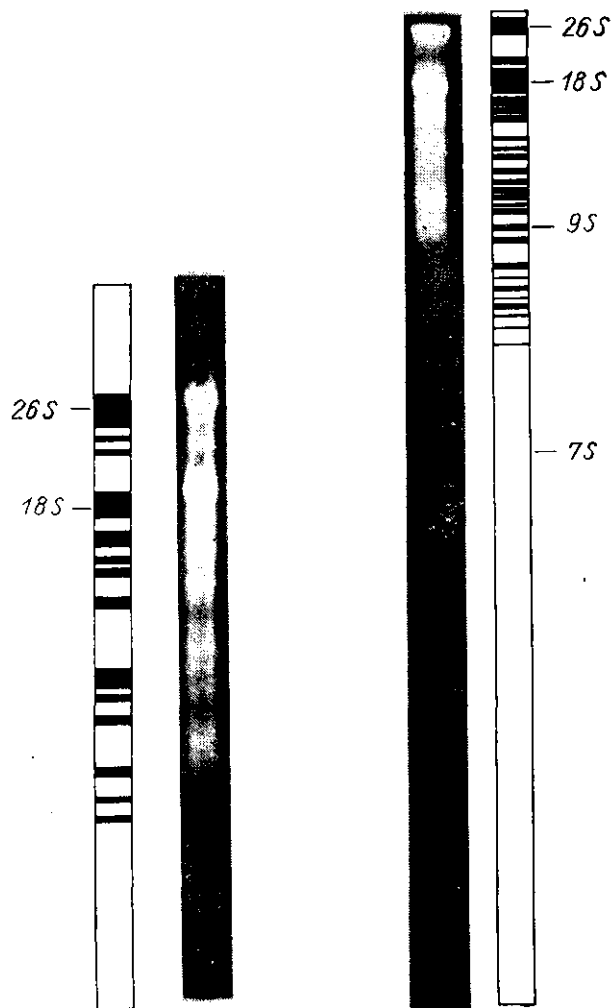


Рис. 1. Электрофореграмма тотальной РНК из эндоспермов ячменя.

Fig. 1. Electrophoresis of total RNA from barley endosperms.

Рис. 2. Электрофореграмма поли(A)⁺мРНК из эндоспермов ячменя.

Fig. 2. Electrophoresis of poly(A)⁺mRNA from barley endosperms.

служила активной матрицей в бесклеточной системе лизата ретикулоцитов, в 12—15 раз повышая включение ³⁵S-метионина в ТХУ-осаждаемую фракцию.

Схема проведения эксперимента представлена на рис. 3. Для конструирования вектора использовали плазмиду *pBR322*; встраивание кДНК проводили по сайту *Pst*I. Вначале, варьируя концентрацию терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и длительность инкубации, добивались того, чтобы по рестриктированному сайту *Pst*I присоединилось около 80 остатков ³H-ТТР. Такой размер политимидилового фрагмента соответствует средней длине полиадениловой последовательности на 3'-конце мРНК. Так как при трансферазной реакции остатки ³H-ТТР присоединяются к обоим концам рестриктированной плазмиды, то при

отжиге ее с поли(А)+мРНК молекулы мРНК будут ориентированы в противоположных направлениях. Чтобы убрать поли(Т)-последовательности с одного конца, плазмиду рестриковали *EcoRI*. В результате получили два фрагмента — 750 и 3612 нуклеотидных пар, каждый из которых содержал только одну политимидиловую последовательность. После препаративного разделения рестриков в дальнейшей работе использовали больший фрагмент; с одной стороны он оканчивается рестрикованным сайтом *EcoRI*, а с другой — сайтом *PstI*, к кото-

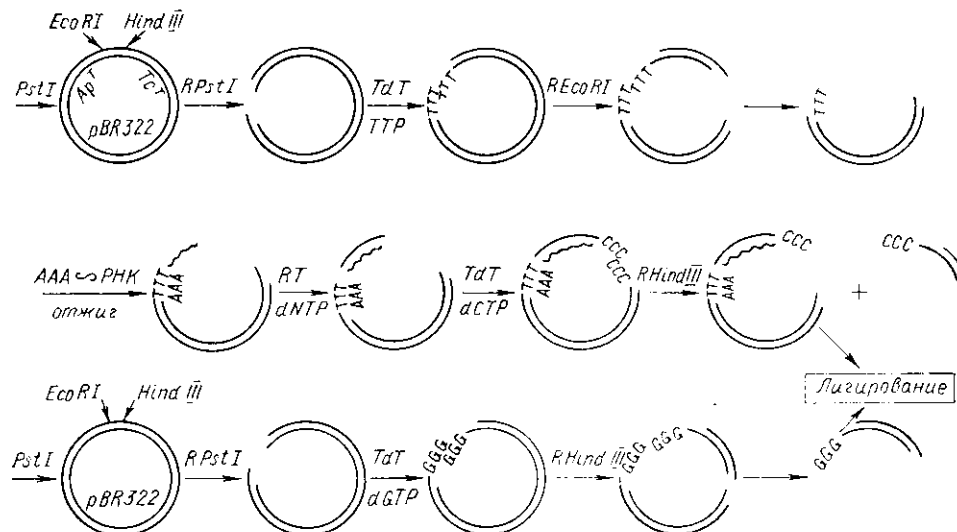


Рис. 3. Схема получения рекомбинантной плазмиды.
Fig. 3. Construction of recombinant plasmid.

рому присоединено около 80 остатков ^3H -ТТР. При отжиге с ним поли(А)+мРНК образуется структура, являющаяся затравкой для работы обратной транскриптазы, т. е. функционирующая как вектор и праймер одновременно.

Для конструирования линкера *pBR322* разрежали по сайту *PstI* и трансферазой присоединяли около 20 остатков ^3H -dGTP, после чего

Трансформация клеток *E. coli*
Transformation of *E. coli* Cells

Вариант	Число колоний	
	<i>Tc</i>	<i>Ap</i>
Компетентные клетки (КК)	—	—
КК+ <i>pBR322</i>	10^7	10^7
КК+вектор—праймер—мРНК—кДНК (без линкера)	—	—
КК+лигазная смесь*	$2 \cdot 10^4$ **	—

* Инкубированная в течение ночи при 7°C с лигазой смесь, содержащая вектор—праймер—мРНК—кДНК и линкер в эквимольных количествах. ** Учитывая, что клетки *E. coli* после трансформации подращивали 3 ч, число трансформантов можно оценить как $2 \cdot 10^3$.

рестриковали *HindIII*. Фрагменты разделяли электрофоретически и в дальнейшей работе использовали меньший фрагмент плазмиды.

Эквимольные количества вектора-праймера и поли(А)+мРНК из эндоспермов ячменя инкубировали для образования комплементарного

спаривания между тимидиловой и адениловой последовательностями, затем проводили синтез первой цепи кДНК с помощью обратной транскриптазы. К 3'-концу кДНК присоединяли около 20 остатков ^3H -dGTP терминальной трансферазой. Поскольку присоединение одновременно происходит и по рестриктированному сайту *EcoRI*, его убирали с помощью рестриктазы *HindIII*, сайт узнавания которой расположен на расстоянии 29 нуклеотидных пар от сайта *EcoRI*. При этом была получена

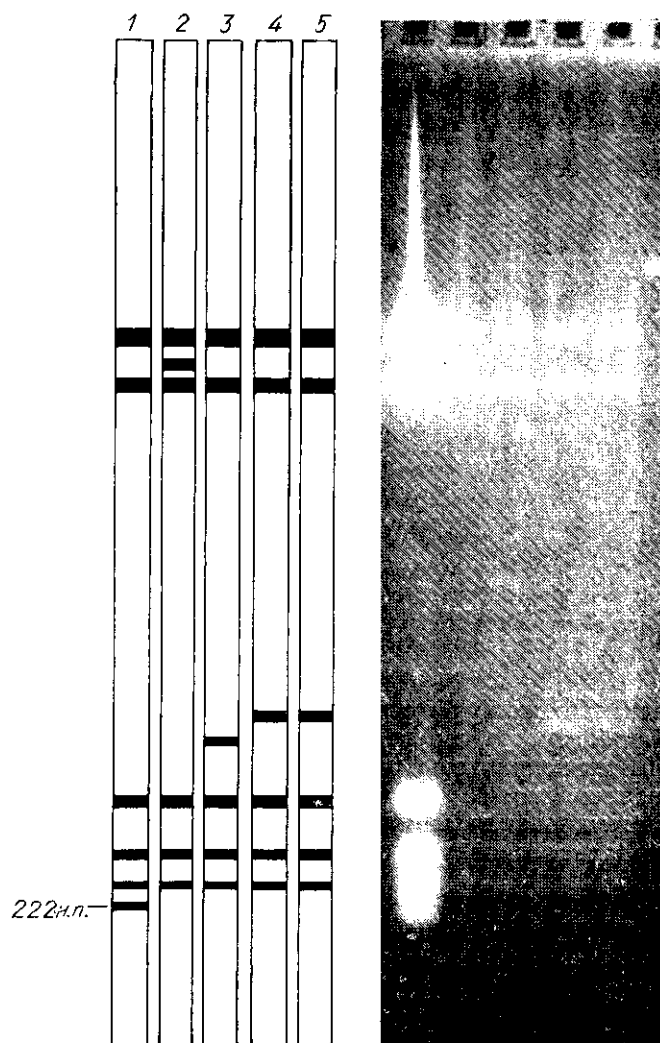


Рис. 4. Электрофореграмма фрагментов ДНК плазмид, образованных после расщепления рестриктазой *BmeI*: 1 — *pBR322*; 2—5 — рекомбинантные плазмиды.

Fig. 4. Restriction endonuclease analysis of the recombinant plasmids: 1 — *BmeI*-digested *pBR322*; 2-5 *BmeI*-digested recombinant plasmids.

молекула, имеющая с одной стороны около 20 остатков dCTP, а с другой — «липкий» конец после рестрикции *HindIII*. В то же время линкер имел тот же «липкий» конец сайта *HindIII* и приблизительно 20 остатков dGTP с другой стороны. Замыкание вектора-праймера с линкером возможно в единственном варианте — при комплементарном спаривании по GC-последовательностям и «слипании» по сайту *HindIII*. После лигирования проводили трансформацию компетентных клеток *E. coli* K802, результаты которой представлены в таблице.

Отбор трансформантов проводили по фенотипу *Ap^rTc^r*, так как ген устойчивости к ампициллину в рекомбинантных плаزمиде нарушен в

результате встраивания кДНК, а ген устойчивости к тетрациклину восстанавливается после лигирования сайта *HindIII*.

Проанализировано несколько десятков трансформантов для определения присутствия в них плазмид и, как оказалось, все исследованные клоны клеток их содержали. Для решения вопроса о размерах вставки в рекомбинантных плазидах они были выделены из 10 клонов и разрезаны рестриктазой *BmeI* (изошизомер *AvaII*). Эта рестриктаза имеет восемь сайтов узнавания на *pBR322*, причем один из образующихся при рестрикции фрагментов длиной 222 нуклеотидных пары имеет сайт для *PstI*. Поскольку встраивание кДНК было проведено именно в этом сайте, то в рекомбинантных молекулах фрагмент длиной 222 нуклеотидных пары должен отсутствовать. На рис. 4 видно, что ни одна рекомбинантная плазида не содержит этот фрагмент, а вместо него в некоторых плазидах появились фрагменты 650—550 нуклеотидных пар.

Скрининг рекомбинантных плазмид методом дот-гибридизации подтвердил высокую эффективность клонирования кДНК в данной системе.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. Н. И. Матвиенко (Ин-т белка АН СССР) за руководство данной работой.

THE USE OF THE OKAYAMA-BERG VECTOR SYSTEM PRINCIPLE FOR BARLEY cDNA CLONING

L. F. Dyachenko, Yu. M. Sivolap

All-Union Breeding-Genetic Institute
of the V. I. Lenin All-Union Academy of Agricultural Sciences, Odessa

Summary

A new approach is stated for obtaining full size cDNA molecules which is based on the Okayama-Berg cloning technique. The properties of poly(A)⁺mRNA from barley endosperms and scheme of obtaining cDNA are described. This cDNA was inserted in plasmid and cloned. Transformation allowed selecting about $2 \cdot 10^3$ clones.

1. Bartels D., Thompson R. D. The characterization of cDNA clones coding for wheat storage proteins.— Nucl. Acids Res., 1983, 11, N 10, p. 2961—2977.
2. Клонирование двунигетивной ДНК — транскрипта мРНК трансферрина крысы / А. П. Рысков, Н. А. Тимченко, Л. Т. Тимченко и др.— Молекуляр. биология, 1984, 18, № 1, с. 104—114.
3. Rabbits T. H. Bacterial cloning of plasmids carrying copies of rabbit globin messenger RNA.— Nature, 1976, 260, N 5501, p. 221—225.
4. Wood K. A., Lee J. C. Integration of synthetic globin genes into a *E. coli* plasmid.— Nucl. Acids Res., 1976, 3, N 2, p. 1961—1971.
5. Sleigh M. J., Both G. W., Brewster G. G. The influenza virus haemagglutinin gene: cloning and characterization of a double-stranded DNA copy.— Ibid, 1979, 7, N 4, p. 879—893.
6. Rose J. K. Complete intergenic and flanking gene sequences from the genome of vesicular stomatitis virus.— Cell, 1980, 19, N 2, p. 415—421.
7. Friedman E. V., Rosbach M. The synthesis of high yields of full-length reverse transcripts of globin mRNAs.— Nucl. Acids Res., 1977, 4, N 10, p. 3455—3463.
8. Phenotypic expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase / A. C. Y. Chang, J. H. Nunberg, R. J. Kaufman et al.— Nature, 1978, 275, N 5711, p. 617—624.
9. Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maniatis T. The primary structure of rabbit β -globin mRNA as determined from cloned DNA.— Cell, 1977, 10, N 3, p. 571—585.
10. Sood A., Pereira D., Weisman S. M. Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B use of an oligonucleotide primer.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, 78, N 1, p. 616—620.
11. Rougeon F., Kourilsky P., Mach B. Insertion of a rabbit β -globin gene sequence into a *E. coli* plasmid.— Nucl. Acids Res., 1975, 2, N 7, p. 2365—2378.
12. 5'-Terminal sequence of eucaryotic mRNA can be cloned with high efficiency / H. Land, M. Grez, H. Hansen et al.— Ibid, 1981, 9, N10, p. 2251—2266.
13. Okayama H., Berg P. High-efficiency cloning of full-length cDNA.— Mol. Cell Biol., 1982, 2, N 2, p. 161—170.

14. *The mRNAs that code for soybean seed protein* / R. N. Beachy, K. A. Barton, J. T. Madison et al.— In: Genome organization and expression in plants. N. Y. : Plenum Press, 1980, p. 273—289.
15. *Messenger RNA for G1 protein of French bean seeds. Cell-free translation and product characterization* / T. C. Hall, Y. Ma, B. U. Buchbinder et al.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, 75, N 7, p. 3196—3200.
16. *Brandt A., Ingversen J. In vitro synthesis of barley endosperm protein on wild type and mutant templates.*— Carlberg Res. Commun., 1976, 41, N 6, p. 312—320.
17. *The synthesis of barley storage proteins* / B. Miflin, J. A. Matthews, S. R. Burgess et al.— In: Genome organization and expression in plants. N. Y. : Plenum Press, 1980, p. 233—243.

Всесоюз. селекционно-генетический ин-т,
Одесса

Получено 13.08.84

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» В 1986 г. ВЫПУСТИТ В СВЕТ КНИГУ:

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ: Сб. науч. тр. — К.: Наукова думка, 1986 (II кв.). — 15 л. — 2 р. 50 к.

Рассматриваются химические, физические, физико-химические, вирусологические, ферментативные и другие методы, апробированные при изучении структуры и функции нуклеиновых кислот и белков, и даются рекомендации по их применению. Освещаются вопросы выделения и очистки биополимеров (включая некоторые ферменты), анализа первичной структуры белков и транспортной РНК. Приведены методы разделения и синтеза пептидов и нуклеозидов, изучения конформации нуклеиновых кислот, их молекулярной организации и биологической активности. Для специалистов в области молекулярной биологии, геномной инженерии, биохимиков и биофизиков, а также аспирантов и студентов вузов.

Предварительные заказы на эту книгу принимают все магазины книготоргов, магазины «Книга — почтой» и «Академкнига».

Просим также пользоваться услугами магазинов — опорных пунктов издательства: Дома книги — магазин № 200 (340048, Донецк-48, ул. Артема, 147а), магазина «Мир книги» (310003, Харьков-3, пл. Советской Украины, 2/2), магазина научно-технической книги № 19 (290006, Львов-6, пл. Рынок, 10), магазина «Техническая книга» (270001, Одесса-1, ул. Ленина, 17) и магазина издательства «Наукова думка» (252001, Киев-1, ул. Кирова, 4).

Магазины в Киеве и во Львове высылают книги иногородним заказчикам наложенным платежом.