

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

СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ *bar* ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

Фосфинотрицин (PPT) является потенциальным ингибитором бактериальной и растительной глутаминсинтетазы и используется как неселективный гербицид. Нами клонирован ген bar, несущий устойчивость в Streptomyces hygrosopicus к биалафосу, — трипептиду, содержащему PPT. Ген bar был помещен под контроль 35S промотора вируса мозаики цветной капусты для переноса в растительные клетки с использованием агробактериальной системы трансформации.

Введение. Получение трансгенных растений, устойчивых к гербицидам нового поколения, имеет большое значение для развития современного сельскохозяйственного производства [1]. Экологическая безопасность этих гербицидов обусловлена их низкой токсичностью и быстрой биodeградацией в почве [2]. Создание гербицидоустойчивых растений возможно за счет введения в состав растительного генома гена или генов, определяющих устойчивость к конкретному гербициду [3]. На этом пути большое внимание привлекают гены, продукты которых способны вступать в реакции с гербицидами и превращать их в нетоксические вещества. Источником таких генов могут служить различные прокариоты. Так, гены устойчивости к гербициду биалафосу представлены в геноме биалафоспродуцирующих стрептомицетов и обуславливают их собственную устойчивость к синтезируемому гербициду.

Биалафос представляет собой трипептид, действующим началом которого является фосфинотрицин (PPT) — токсичный аналог глутаминовой кислоты. Наряду с генами, участвующими в биосинтезе биалафоса, в геноме *Streptomyces hygrosopicus* имеется ген (*bar*), определяющий их собственную устойчивость к данному гербициду. Ген *bar* кодирует фосфинотрицинацетилтрансферазу (PAT), которая ацетилирует свободную NH₂-группу PPT и тем самым делает его нетоксичным [4].

Клонирование гена *bar* и передача его в растительные геномы в соответствующих экспрессирующихся конструкциях дает возможность получить биалафосустойчивые трансгенные растения [5].

В настоящей работе мы сообщаем о создании конструкций с геном *bar*, способных к трансформации растений и экспрессии в них.

Материалы и методы. В качестве векторов использовали плазмиды *pUC19* [6], *pCAMV* [7], *pBin19* [8]. Для трансформации применяли штамм *Escherichia coli* JM101. *E. coli* выращивали на среде LB [9], агробактерии — на среде YEB [10].

Щелочное выделение плазмидной ДНК, рестрикцию, лигирование и электрофорез ДНК, элюцию ДНК из геля и ее очистку, бактериальную трансформацию осуществляли общепринятыми методами [8, 9]. Конъюгацию, необходимую для переноса нужной плазмиды из *E. coli* в агробактерию, проводили с помощью трехродительского скрещивания [8].

Использованные в работе ферменты получены в НПК «Биотех» (Москва).

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

Результаты и обсуждение. Ранее мы сообщали о клонировании гена, определяющего устойчивость к гербициду биалафосу (*bar*), из геномной ДНК *S. hygroscopicus* [11]. Ген *bar* был клонирован в *E. coli* (штамм JM101) с использованием вектора *pUC19*. Построена рестрикционная карта клонированного фрагмента ДНК, содержащего ген *bar* (рис. 1).

В *S. hygroscopicus* иницирующим кодоном для гена *bar* является GTG. Для улучшения экспрессии гена в растениях мы заменили кодон GTG на иницирующий ATG-кодон. С этой целью фрагмент, содержащий ген *bar*, был вырезан из полилинкерной области плазмиды *pBA1*

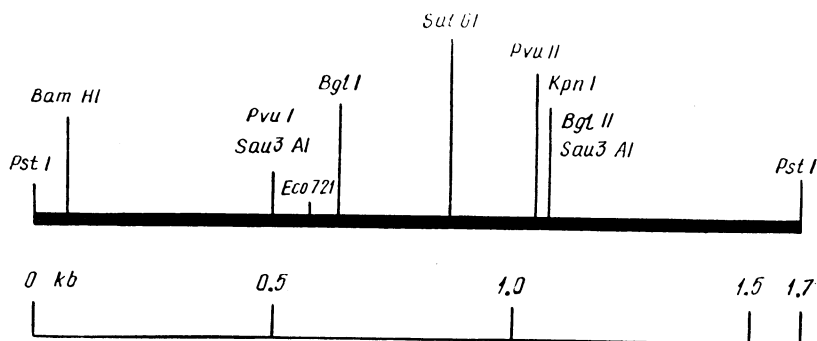
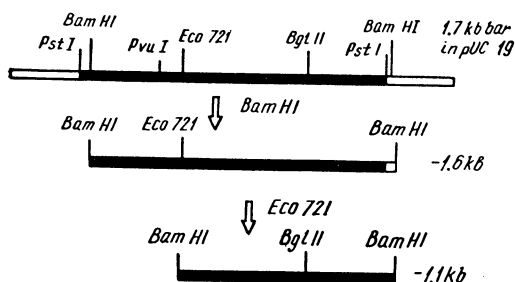


Рис. 1. Рестрикционная карта *PstI*-фрагмента геномной ДНК *S. hygroscopicus*, несущего ген устойчивости к гербициду биалафосу

по рестриктазе *VamHI* (рис. 2). Полученный таким образом фрагмент размером 1,6 тыс. п. н. гидролизовали рестриктазой *Eco72I*, сайт узнавания которой находится рядом с иницирующим GTG-кодоном. Затем эту область гена лигировали с двухцепочечными синтетическими олигонуклеотидами, содержащими иницирующий ATG-кодон и предшествующий этому кодону сайт узнавания рестриктазы *VamHI* (рис. 3).



Для конструирования рекомбинантной плазмиды, обес-

Рис. 2. Получение *VamHI*-фрагмента с геном *bar*

печивающей экспрессию *bar*-гена *S. hygroscopicus* в растениях, полученный *VamHI*-фрагмент размером 1,1 тыс. п. н. (рис. 2) был клонирован в соответствующий *VamHI*-сайт плазмиды *pCAMV*, содержащей 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты и *poly(A)*-область гена нопалинсинтетазы.

Рекомбинантные клоны, содержащие ген *bar*, отбирали методом реплик на минимальной среде, содержащей ампициллин и от 1 до 10 мкг/мл биалафоса. Отобраны клоны, устойчивые к концентрации биалафоса до 10 мкг/мл. Экспрессия генов под 35S-промотором возможна в *E. coli*, так как известно, что 5'-проксимальная часть области энхансера 35S-промотора содержит «псевдопромотор» для *E. coli* [12].

Рекомбинантные плазмиды, выделенные из полученных клонов, содержали дополнительный *VamHI*-фрагмент размером 1,1 тыс. п. н. Карта рекомбинантной плазмиды *pBA2* показана на рис. 4.

Затем нами была сконструирована рекомбинантная плаزمида *pBA3*, необходимая для передачи *bar*-гена в растения посредством агробактериальной системы. Для этого *HindIII*-фрагмент из плазмиды *pBA2*, содержащий 35S-промотор, *bar*-ген и *poly(A)*-область

гена нопалинсинтетазы, клонировали в соответствующий сайт плазмиды *pBin19*. Плазмида *pBin19* является бинарным вектором, полученным на основе репликона *pRK252*, с широким кругом хозяев, который способен реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях.

Для трансформации использовали штамм *E. coli* JM101. Рекомбинантные клоны отбирали на среде LB с X-gal, IPTG и ампициллином. Все рекомбинантные плазмиды включали *HindIII*-фрагмент размером 1,7 тыс. п. н. Рекомбинантные клоны *E. coli*, содержащие плазмиду *pBA3*, устойчивы на минимальной среде к биалафосу в концентрации до 10 мкг/мл. Карта плазмиды *pBA3* показана на рис. 5.

Конъюгацию, необходимую для переноса плазмиды *pBA3* из *E. coli* в агробактерию, осуществляли с помощью трехродительского скрещивания. В большинстве клонирующих векторов бинарных систем используют начало репликации плазмиды *RK2* и для их конъюгационного пере-

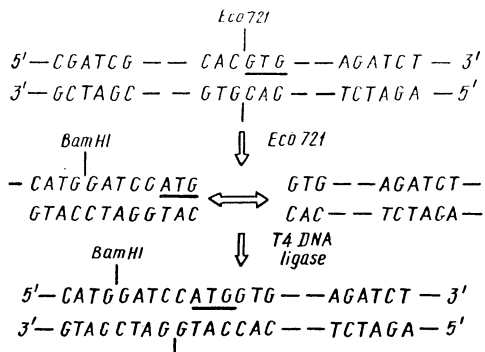


Рис. 3. Замена инициирующего кодона в гене *bar*

носа обычно применяют плазмиду-помощник *pRK2013* [13]. Мы использовали в качестве реципиентного штамма штамм *Agrobacterium tumefaciens* 3850, а в качестве плазмиды-помощника — плазмиду *pRK2013* в штамме *E. coli* HB101. Штамм *A. tumefaciens* 3850 ус-

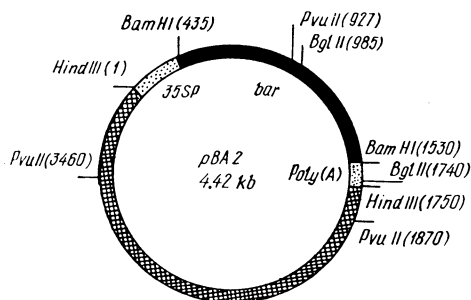


Рис. 4. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды *pBA2*, несущей устойчивость к биалафосу

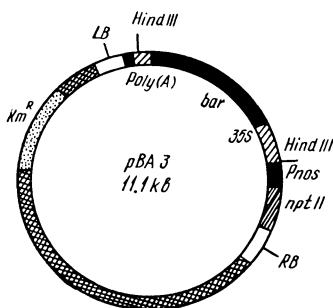


Рис. 5. Карта рекомбинантной плазмиды *pBA3*, несущей ген *bar*

тойчив к антибиотику рифампицину (Rf), а штаммы *E. coli* HB101/*pRK2013* и JM101/*pBA3* устойчивы к канамицину (Km). Таким образом, трансконъюгаты агробактерий, содержащих рекомбинантные последовательности, мы отбирали как колонии, резистентные к Rf и Km. Полученные рекомбинантные клоны *A. tumefaciens* 3850/*pBA3* устойчивы на минимальной среде к гербициду биалафосу в концентрации до 10 мкг/мл, в то время как рост исходного штамма ингибируется гербицидом в концентрации 1 мкг/мл.

Штамм *A. tumefaciens* 3850/*pBA3* будет использован в дальнейшем при трансформации растительных клеток для получения устойчивых к гербициду биалафосу трансгенных растений.

СТВОРЕННЯ ЕКСПРЕСУЮЧИХ КОНСТРУКЦІЙ З ГЕНОМ *BAR* ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

Резюме

Фосфінотрицин (PPT) є потенціальним інгібітором бактеріальної і рослинної глутамінсинтетази і використовується як неселективний гербіцид. Нами клоновано ген *bar*, який несе стійкість в *Streptomyces hygrosopicus* до біалафосу, — трипептиду, що містить PPT. Ген *bar* було розміщено під контроль 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти для переносу в рослинні клітини з використанням агробактеріальної системи трансформації.

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

CREATION OF THE EXPRESSING CONSTRUCTIONS WITH *BAR* GENE FOR PLANT TRANSFORMATION

Summary

Phosphinothrioin (PPT) is a potent inhibitor of glutamine synthetase in bacteria and plants and is used as a non-selective herbicide. The *bar* gene which confers resistance in *Streptomyces hygrosopicus* to bialaphos, a tripeptide containing PPT, was cloned. The *bar* gene was placed under control of the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus for transferring to plant cells using agrobacterium — mediated transformation.

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. 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.
4. Murakami T., Anzai H., Imai S. et al. The bialaphos genes of *Streptomyces hygrosopicus*: Molecular cloning and characterization of gene cluster // Mol. and Gen. Genet.—1986.—205.— P. 42—50.
5. De Block M., Botterman J., Vandewiete M. et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // EMBO J.—1987.—6.— P. 2513—2518.
6. Yanisch O., Perron C., Viera J., Messing J. Improved *M13* of the *M13 mp18* and *pUC19* vectors // Gene.—1985.—33.— P. 103—119.
7. Fromm M. E., Taylor L. P., Walbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation // Nature.—1986.—319.— P. 791—793.
8. Draper J., Scott R., Armitage P. Plant genetic transformation and gene expression.—Oxford, 1988.— P. 8—62.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
10. Koekman B. P., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. Localization of the replication control region on the physical map of the octopine *Ti-plasmid* // Plasmid.—1980.—4.— P. 184—195.
11. Заяц А. И., Стехін І. Н., Путиліна Н. В., Левенко Б. А. Клонирование гена устойчивости к гербициду биалафосу // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 3—4.— С. 84—88.
12. Кузьмин Е. В., Шаденков А. А., Узбекова С. В., Шемякин М. Ф. Создание бифункциональных производных гена инсектотоксина *Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki* для экспрессии в трансгенных растениях // Докл. АН СССР.—1991.—321.— С. 412—415.
13. Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D. R. Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria—construction of a gene bank of *Rhizobium melilotis* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77.— P. 7347—7351.

Ин-т физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

Получено 06.01.94