

с увеличением новосинтезированных мРНК или это обусловлено активацией процесса инициации биосинтеза белка на предшествующих матрицах, пока еще не выяснено.

Таким образом, экспериментально установлено повышение полипептидного синтеза на эндогенных матрицах в бесклеточной системе, выделенной из зародышей высокогетерозисных гибридных растений. При добавлении экзогенной матрицы процент стимуляции синтеза у родительских форм таких гибридов значительно выше, чем в поколении F₁.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Активность рибосом проростков гибридных и инбредных форм кукурузы в бесклеточной системе синтеза белка* / Л. Т. Оплачко, С. С. Костышин, Л. А. Яковлева, М. М. Марченко // Физиология растений.— 1985.—32, № 4.— С. 710—714.
2. *Ерксев М. И., Кудоярова Г. Р.* Изучение активности белоксинтезирующей системы у гетерозисных гибридов кукурузы // Там же.— 1981.—28, № 4.— С. 880—883.
3. *Конярев В. Г.* Биохимия и молекулярная генетика гетерозиса // Гетерозис.— Минск : Наука и техника, 1982.— С. 163—178.
4. *Yamada M., Ishige T., Ohkawa Y.* Reappraisal of Ashby's hypothesis on heterosis of physiological traits in maize, *Zea mays* L. // Euphytica.— 1985.—34, N 3.— P. 593—598.
5. *Yamada M.* Heterosis in embryo of maize, *Zea mays* L. // Bull. Nat. Inst. Agrobiol. Res.— 1985.— N 1.— P. 85—98.
6. *Roberts B. E., Patterson B. M.* Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.—70, N 5.— P. 2330—2334.
7. *Marcus A., Efron D., Weeks D. P.* The wheat embryo cell-free system // Meth. Enzymol.— 1974.—30.— P. 749—761.
8. *Mans R. J., Novelli G. D.* Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method // Arch. Biochem. and Biophys.— 1961.—94.— P. 48—53.
9. *Синтез РНК и белка в ранний период прорастания зародышей кукурузы в связи с гетерозисом* / С. С. Костышин, Л. Н. Хлус, Л. Т. Оплачко, М. М. Марченко // С.-х. биология.— 1988.— № 1.— С. 35—38.

Черновин. гос. ун-т

Получено 15.03.88

PECULIARITIES OF PROTEIN SYNTHESIS ON ENDOGENOUS mRNAs IN CELL-FREE SYSTEMS FROM GERMS OF THE DIFFERENT MAIZE FORMS

M. M. Marchenko, L. T. Oplachko, S. S. Kostyshin, L. S. Yazlovitskaya
University, Chernovtsy

Summary

The activity of polypeptide synthesis on the endogenous mRNAs and poly(U) in the cell-free system from germs of the different maize forms is studied. Translational activity on the endogenous mRNAs in the cell-free system isolated from the hybrid maize germs is established to increase. The polypeptide synthesis stimulation by poly(U) in parental forms of super heterosis hybrids is higher than in generation F₁.

УДК 577.2.08

Е. Б. Патон, А. Г. Терентьев

ПРЕИМУЩЕСТВА Z-gal ПРИ СЕЛЕКЦИИ РЕКОМБИНАНТОВ ПО Lac-ФЕНОТИПУ

Рассмотрены преимущества использования Z-gal в качестве хромогенного субстрата β-галактозидазы при селекции рекомбинантов по Lac-фенотипу.

Lac⁺-фенотип, обеспечиваемый экспрессией гена *lacZ*, является одним из маркеров, наиболее часто используемых в практике конструирования

рекомбинантных ДНК. Селекция по этому признаку проводится при использовании в качестве векторных средств широкого круга плазмид, фагов и их гибридов — фазмид [1—4]. Часто она основывается на утере рекомбинантами *Lac*⁺-фенотипа вследствие встраивания чужеродной ДНК в структурную последовательность гена *lacZ*, нарушающую ее рамку считывания. Для визуализации *Lac*⁺-фенотипа среда для отбора рекомбинантов обычно включает хромогенный субстрат β-галактозидазы X-gal (5-бром, 4-хлор, 3-индолил, β-D-галактопиранозид), обуславливающий голубую окраску *Lac*⁺-колоний. На практике мы столкнулись с необходимостью в целом ряде случаев вести отбор рекомбинантов на основании восстановления активности β-галактозидазы при восполнении структурной и/или регуляторной областей гена *lacZ*. Применяя X- и Z-gal (5-бром, 3-индолил, β-D-галактопиранозид), мы заметили, что последний обеспечивает более интенсивную синюю окраску *Lac*⁺-клонов. В определенных случаях, когда при первичном скрининге рекомбинантов желательнее оценить уровень экспрессии гена *lacZ*, варибельность и большая интенсивность окраски является преимуществом, облегчающей селекцию. В частности, при конструировании рекомбинантной плазмиды на основе *pUC18*, в которой промотор *lac* удален или репрессирован, необходимо было выбрать ориентацию встраиваемого фрагмента ДНК, обеспечивающую транскрипцию образовавшегося гена *rplL'-lacZ'* лишь с очень слабого по сравнению с *P_{lac}* промотора *P_{L12}* [5]. Уровень активности β-галактозидазы в данном случае был меньше 1 ед. Миллера, что в 100—200 раз ниже такового в случае транскрипции с *P_{lac}*. Успешный отбор рекомбинантов, таким образом, прямо соотносился с интенсивностью обеспечиваемого Z-gal *Lac*⁺-фенотипа. Мы убедились в преимуществах Z-gal и при работе с плазмидой *pNM481* [6]. В данном случае возможность оценки уровня экспрессии гибридных генов *lacZ*, коррелирующая с интенсивностью синей окраски клонов, обеспечила удобство первичного скрининга рекомбинантных плазмид, когда ген *lacZ* становился чувствительным к сигналам инициации транскрипции и трансляции разной эффективности [7]. В сконструированных рекомбинантных плаزمиде *pIK5*, содержащей ген *rplL'-lacZ'*, и *pIK7* с геном *rplL'-lacZ'* транскрипция гибридных генов обеспечивалась весьма слабым промотором *P₄* векторной плазмиды [7]. В задачу исследования входило сравнение уровня экспрессии этих генов, обеспечиваемого данным промотором и промоторами с другой силой, но идентичными для обоих генов. Селекцию рекомбинантных плазмид после лигирования *pIK5* и *pIK7* с фрагментами ДНК, содержащими промоторы *P_B* и *P_{L11}*, значительно облегчила возможность визуальной предварительной оценки уровня экспрессии гена *lacZ*. Преимуществом возможности первичного скрининга рекомбинантов по интенсивности обеспечиваемой Z-gal синей окраски может быть случай клонирования чужеродной ДНК методом «shotgun», в результате чего функциональная активность гена *lacZ* может быть восстановлена при слиянии его с разными фрагментами, отличающимися, однако, по эффективности обеспечиваемого уровня экспрессии β-галактозидазы.

Суммируя все вышеизложенное, можно заключить, что применение Z-gal, обеспечивающего более интенсивную окраску *Lac*⁺-колоний *E. coli*, позволяет в целом ряде случаев осуществить простой и достоверный первичный скрининг рекомбинантов по этому признаку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yunish-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: sequences nucleotide of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene.— 1985.—33, N 1.— P. 103—119.
2. Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Ibid.— 1982.—19, N 2.— P. 259—268.
3. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (F1) as vectors for recombinant DNA — a review // Ibid.— N 1.— P. 1—10.

4. Dente L., Cesareni G., Cortese R. *pEMBL*: a new family of single stranded plasmids // Nucl. Acids Res.—1982.—11, N 6.—P. 1645—1655.
5. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Однонаправленная ориентация при клонировании фрагментов *rplKAIL*-генов *Escherichia coli* в многокопийной плазмиде *pUC* // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 1.—С. 58—66.
6. Minton N. Improved plasmid vectors for isolation of translation lac gene fusions // Gene.—1984.—31, N 2.—P. 269—273.
7. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Изучение регуляции экспрессии гена *rplL Escherichia coli* методом слияния с геном *lacZ* в плазмиде *pNM481* // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 2.—С. 99—102.

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

Получено 19.01.89

ADVANTAGES OF Z-GAL DURING SELECTION OF RECOMBINANTS ON LAC PHENOTYPE

E. B. Paton, A. G. Terentyev

Summary

Advantages of Z-gal use as a chromogenic substrate of β -galactosidase, when selecting recombinants by Lac phenotype, are discussed.