

© Е. В. Межевая, Д. Р. Бериташвили, В. П. Степанова,
Б. Ф. Яровой, И. А. Захаров, 1990

ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕГРАЦИИ ПЛАЗМИДЫ *pYF91* В ДРОЖЖЕВЫЕ ХРОМОСОМЫ МЕТОДОМ ПУЛЬС-ФОРЕЗА

*Изучены электрокариотипы клеток дрожжевых штаммов-интегрантов. У каждого из изучаемых штаммов в дрожжевые хромосомы I, III, VI, IX, XI интегрирована плазмида *pYF91*. На электрофореграммах у всех пяти интегрантов обнаружено изменение местоположения полосы, соответствующей их химерной хромосоме. Показано, что увеличение размера дрожжевой хромосомы на 13 200 пар оснований (п. о.) за счет плазмиды *pYF91* может быть выявлено с помощью пульс-фореза.*

Недавно предложенный метод пульс-электрофореза, позволяющий разделять большие молекулы ДНК [1, 2], был с успехом использован для идентификации хромосом дрожжей-сахаромицетов. В настоящей работе мы попытались применить этот метод для изучения интеграции плазмиды в дрожжевые хромосомы. Оказалось, что метод не только позволяет идентифицировать те хромосомы, в которые произошла интеграция, но и «визуализировать» последствия включения плазмиды в хромосому по увеличению размера последней.

Материалы и методы. В работе использовали шесть гаплоидных штаммов дрожжей-сахаромицетов одинакового генотипа (*cir^o*)*MATa leu2-3, 2-112ura3* (*cir^o* — отсутствие 2 мкм плазмиды). В качестве контроля использовали штамм, не содержащий плазмиды *pYF91*. Остальные пять штаммов — это интегранты, несущие плазмиду *pYF91* в I, III, VI, IX и XI хромосомах соответственно. Эписомная плазмида *pYF91* размером 13 200 п. о. содержит последовательности бактериального генома *pBR322*, 2 мкм ДНК дрожжей, дрожжевой ген *LEU2*, а также повторяющиеся в геноме дрожжей последовательности *Ty1* и «дельта» [3].

Для того чтобы избавиться от митохондриальной ДНК, клетки штаммов-интегрантов обрабатывали бромистым этидием по известной методике [4] для получения генотипа *rho^o* (*rho^o* — отсутствие митохондриальной ДНК).

Аппарат для пульс-фореза изготовляли сами. Он представляет собой модификацию аппарата, предложенного Карлом и Олсоном [2]. На рис. 1 представлена схема расположения электродов в данном приборе. Такая геометрия электродов в созданной конструкции повышает однородность электрического поля, осуществляя тем самым движение молекул фактически по прямой.

Приготовление агарозных блоков, содержащих дрожжевую ДНК. Препараты для разделения хромосом дрожжей готовили по методу [2] с некоторыми модификациями. Клетки дрожжей выращивали в 100 мл богатой жидкой среды, содержащей 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % пептона и 2 % глюкозы, в течение 16—18 ч. Выросшие клетки дважды отмывали от среды раствором ЭДТА (50 мМ), pH 8,0 и осаждали центрифугированием при 1 000 *g* 5 мин в условиях комнатной температуры. К клеточному осадку (в 1 мл 50 мМ ЭДТА) добавляли 5 мкл β-меркаптоэтанол и 100 мкг зимолазы 20Т, приготовленной на буфере SCE: сорбитол — 1 М, цитрат натрия — 0,1 М, ЭДТА — 0,06 М, pH 7,5. (В некоторых экспериментах вместо зимолазы использовали дрожжелитин (НПО «Фермент», Вильнюс) в концентрации 100—200 мкг/мл клеточной суспензии. Препараты хромосомных ДНК, приготовленные с помощью дрожжелитина, были вполне удовлетворительными, но не способными к длительному хранению).

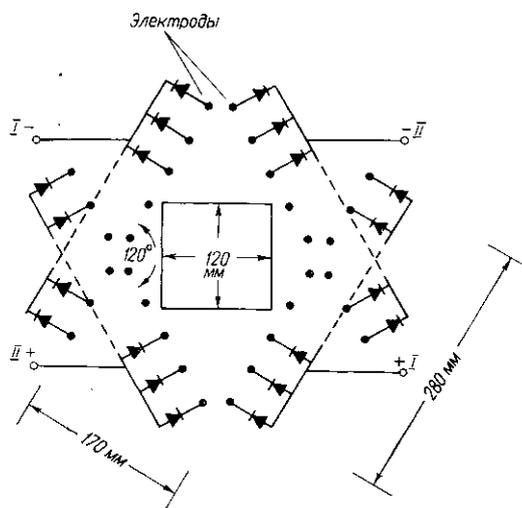
Полученную суспензию клеток встряхивали в течение нескольких секунд и затем смешивали с 1 % легкоплавкой агарозой («Bio-Rad», США) в водяной бане при 45 °С в соотношении 1 : 1. Клетки, соединенные с агарозой, энергично перемешивали на встряхивателе («Vortex») и быстро разливали в шаблоны для получения блоков геля толщиной 1,5 мм. В качестве шаблона использовали пару изготовленных из плексиглаза чашек Петри диаметром 40 мм, донца которых склеивали липкой лентой. Щель, образующаяся между соединенными таким образом донцами, равна примерно 1,5 мм. Предварительно в бортике каждого донца делали по одному пазу так, чтобы туда входил наконечник автоматической пипетки, которой и вводили суспензию в агарозе

(важно, чтобы в агарозе не было пузырей). Для застывания геля в шаблонах их оставляли на несколько минут при комнатной температуре. Затем шаблоны упаковывали в полиэтиленовые мешки для предотвращения высыхания геля и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 4—8 ч. После инкубации гели переносили в другие чашки с лизирующим раствором, содержащим 0,5 М ЭДТА, рН 9,5, 1 % лаурилсаркозилат натрия, 250—500 мкг/мл протеназы К (или проназы, предварительно инкубированной при 37 °С в течение 1 ч). Погруженный в раствор гель инкубировали в термостате при 55 °С в течение суток, после чего кусочки гелей переносили в 0,25 М ЭДТА, рН 9,0, и хранили при температуре 4 °С.

Приготовление агарозных блоков, содержащих лямбда-олигомеры. В качестве маркеров для определения молекулярной массы разделенных

Рис. 1. Схема расположения электродов и пластины агарозного геля в аппарате пульс-фореза: I и II — электродные группы. Анод и катод представлены восемью точечными платиновыми электродами. Каждый электрод подключается к источнику питания через свой диод. Все 32 электрода (и диоды) смонтированы на одной основе, являющейся крышкой для ванны прибора. Размер ванны 380×380×70

Fig. 1. The position of electrodes and agarose gel in the pulse-phoresis apparatus: I and II — groups of electrodes. Anode and cathode have 8 point platinum electrodes. Each of them is connected with the power supply by its own diode. All the electrodes are placed on the cover of the apparatus tank. The tank size is 380×380×70 mm



пульс-форезом хромосомных ДНК использовали олигомеры ДНК фага лямбда. Приготовление олигомеров проводили по методу, предложенному Омменом и Феркером [5].

ДНК фага лямбда (НПО «Фермент», Вильнюс) суспендировали в буфере SE: NaCl — 75 мМ, ЭДТА — 25 мМ, рН 7,4, до конечной концентрации 150—300 мкг/мл. Суспензию фага смешивали с равным объемом 1 % легкоплавкой агарозы («Bio-Rad», США), приготовленной в буфере SE при 45 °С. Полученный гель помещали в буфер (0,5 М ЭДТА, рН 9,5, 1 % саркозил) и инкубировали сначала в термостате при 37 °С в течение ночи, затем при комнатной температуре — в течение суток. Блоки геля с олигомерами ДНК лямбда фага хранили в буфере TE: трис — 10 мМ, ЭДТА — 1,0 мМ, 4 °С.

Электрофорез. Пульс-электрофорез проводили в 1 %-ном агарозном геле («Serva», ФРГ, или «Bio-Rad», США), используя пластины размером 120×120 мм и толщиной 4 мм. Из агарозных блоков, содержащих ДНК дрожжевых хромосом или олигомеры ДНК фага лямбда, вырезали небольшие бруски. Вырезанные куски помещали на дно ячейки, проделанной в агарозной пластинке, и заправляли 1 % легкоплавкой агарозой. Приготовленную пластину погружали в буфер TBE, рН 8,2. Буфер содержал трис — 45 мМ, H₃BO₃ — 45 мМ, Na₂-ЭДТА — 1,25 мМ. Электрофорез проводили в следующих условиях: напряжение — 110, 170 В, время импульса 30, 50, 110 с, температура 12—14 °С. После завершения пульс-фореза пластину с гелем окрашивали бромистым этидием и затем фотографировали на пленке микрат-300 («Свема», Казань) в отраженном УФ-свете (300 нм) через красный фильтр.

Результаты и обсуждение. Известно, что размеры хромосомных ДНК у дрожжей сахаромицетов находятся в широком диапазоне: от 240 до 3000 т. п. о. Чтобы провести электрофоретическое разделение столь значительно различающихся по массе хромосомных ДНК, следовало отработать оптимальный режим их разгонки. Поэтому мы изучили влияние времени импульса и общей продолжительности фореза на расхождение различных фракций хромосом.

Как видно из рис. 2, при проведении фореза с использованием, в основном, импульсов 30 и 50 с (режим *a*) хорошо разделяются хромосомы только легких фракций. В том случае, когда импульс увеличива-

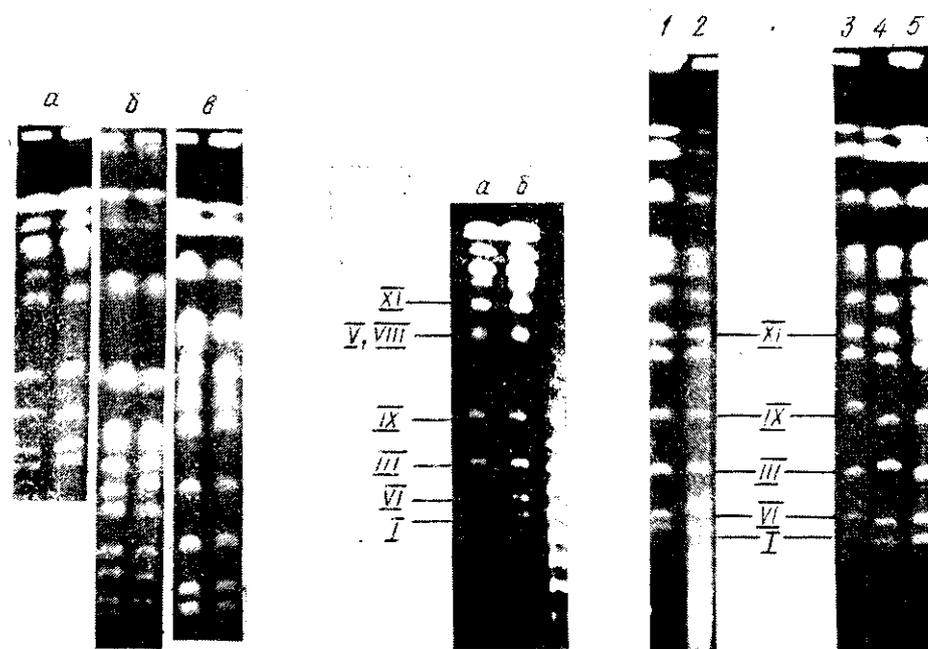


Рис. 2. Влияние времени импульса и общей продолжительности фореза на расхождение хромосом разных молекулярных масс. Режим *a*: напряжение 170 В, импульс 50 с, продолжительность 2 ч; напряжение 110 В, импульс 50 с, продолжительность 17 ч; напряжение 110 В, импульс 100 с, продолжительность 7 ч; режим *b*: напряжение 170 В, импульс 30 с, продолжительность 1 ч; напряжение 170 В, импульс 50 с, продолжительность 2 ч; напряжение 110 В, импульс 100 с, продолжительность 41 ч; режим *v*: напряжение 170 В, импульс 50 с, продолжительность 2 ч; напряжение 110 В, импульс 50 с, продолжительность 18 ч; напряжение 110 В, импульс 100 с, продолжительность 27 ч

Fig. 2. The effect of the switch time and the duration of electrophoresis on separation of chromosomes with different molecular weights. Regime *a*: voltage 170 V, impulse 50 s, duration 2 h; voltage 110 V, impulse 50 s, duration 17 h; voltage 110 V, impulse 100 s, duration 7 h. Regime *b*: voltage 170 V, impulse 30 s, duration 1 hour; voltage 170 V, impulse 50 s, duration 2 h; voltage 110 V, impulse 100 s, duration 41 h. Regime *v*: voltage 170 V, impulse 50 s, duration 2 h; voltage 110 V, impulse 50 s, duration 18 hour; voltage 110 V, impulse 100 s, duration 27 h

Рис. 3. Электрокартиотип контрольного штамма дрожжей и результаты измерения массы его хромосом (в скобках указан размер хромосомы по данным работы [6]) с помощью олигомеров ДНК фага лямбда: XI — 650(690); V, VIII — 580(600); IX — 440(450); III — 360(360); VI — 280(280); I — 250(250) т. п. о.; *a* — картиотип контрольного штамма; *b* — олигомеры ДНК фага лямбда. Форез проводили в режиме для разгонки хромосом легкой фракции

Fig. 3. Electrokaryotype of the control yeast strain and the results from measurements of its chromosome weight by means of phage DNA oligomers. On the left—the data from paper of Carle and Olson /6/. On the right — the results of this work. *a* — control strains electrokaryotype; *b* — the phage DNA oligomers. The electrophoresis was performed under conditions of the light chromosome fraction resolution

Рис. 4. Электрокартиотипы пяти дрожжевых штаммов-интегрантов: 1 — картиотип штамма с интеграцией плазмиды *pYF91* в I хромосому; 2—5 — картиотипы штаммов с интеграцией плазмиды в хромосомы XI, IX, III, VI соответственно

Fig. 4. Electrokaryotypes of 5 yeast integrants: 1 — karyotype of the strain with integration of plasmid *pYF91* into chromosome I; 2 — 5 — into chromosomes XI, IX, III, VI, respectively

ется до 100 с (режим *b*) имеет место разделение преимущественно тяжелых фракций. Для разгонки одновременно обеих категорий ДНК оказалось наиболее эффективным использование режима *v*-комбинации импульсов 50 и 100 с при равной их продолжительности с общей длительностью фореза около двух суток.

Результаты изучения кариотипов дрожжевых штаммов *Saccharomyces cerevisiae* представлены на рис. 3 и 4. На рис. 3 показано расположение полос в геле у контрольного штамма, в геноме которого нет плазмиды *pYF91*. Для идентификации образующихся полос в геле с соответствующими хромосомами следовало измерить молекулярные массы разделенных молекул. С этой целью были получены олигомеры ДНК фага лямбда размером от 50 (мономер) до 1150 т. п.

Как видно из рисунка, данные по измерению хромосомных молекул ДНК с помощью олигомерного маркера в основном соответствуют результатам, полученным Карлом и Олсоном [6].

Такое совпадение значений, а также сопоставление их с размерами хромосом, полученными генетическими методами, позволяет нам выявить соответствующие полосы на фореграмме определенным хромосомам. Некоторые незначительные расхождения в результатах могут быть объяснены полиморфизмом длины отдельных хромосом, который может проявиться у штаммов одного вида, но разного происхождения [6, 7]. Случай полиморфизма у дрожжей *S. cerevisiae* мы также наблюдали в исследованиях, проведенных совместно с сотрудниками ВНИИГидролиза Давыденко и др. при сравнении электрокаротинов ряда гаплоидных штаммов-киллеров (неопубликованные данные).

Изменение размеров хромосом было обнаружено нами и при изучении кариотипов клеток штаммов-интегрантов. Результаты этих исследований приведены на рис. 4. У интегрантов на всех пяти электрофореграммах зафиксировано изменение расположения полос в геле. Для каждого интегранта показано смещение именно той полосы, которая соответствует его химерной хромосоме, т. е. I, VI, III, IX, XI соответственно. Очевидно, что увеличение размера химерной хромосомы на 13 200 п. о. за счет плазмиды *pYF91* может быть выявлено с помощью нуль-фореза.

В исследованиях, проведенных нами ранее, хромосомная локализация плазмиды *pYF91* у интегрантов была определена, в основном, генетическими методами [8]. Данные, полученные в этой работе для XI хромосомы, были особенно неубедительными и позволяли только предполагать, но не утверждать факт интеграции плазмиды. С помощью нуль-фореза было показано, что хромосомы I, III, VI, IX и XI в клетках соответствующих штаммов являются действительно химерными. Таким образом, нам удалось подтвердить интеграцию плазмиды *pYF91* в дрожжевые хромосомы.

Имея такую коллекцию штаммов-интегрантов, можно визуально определить местоположение каждой хромосомы в электрофоретическом кариотипе по изменению соответствующей полосы в геле. В этом случае не требуется использования трудоемких методов, которые обычно необходимы для идентификации дрожжевых хромосом.

Таким образом, метод нуль-фореза обладает большой разрешающей способностью, позволяя видеть сравнительно небольшие увеличения массы хромосом, по крайней мере легких фракций. Подобное увеличение массы можно, вероятно, увидеть и для тяжелых фракций хромосом, если подобрать соответствующий режим работы нуль-фореза.

Упомянутые возможности метода указывают на перспективность его использования для изучения интеграции чужеродных ДНК в дрожжевые хромосомы.

PULSED FIELD GRADIENT ELECTROPHORESIS STUDY OF *pYF91*
PLASMID INTEGRATION INTO YEAST CHROMOSOMES

E. V. Mezhevaya, V. P. Stepanova, B. F. Yarovoy

B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Gatchina

D. R. Beritashvili

Institute of Molecular Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

I. A. Zakharov

Institute of General Genetics,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

S u m m a r y

An electrophoretic karyotyping of yeast strains with the integrated plasmid was performed. The collection used was comprised of strains with plasmid *pYF91* integrated in several chromosomes, namely I, III, VI, IX, XI, respectively. Some bands positions for integrants were clearly different from those of the recipient strain. In each case only the chimaeric chromosome position changed. Thus, it is shown possible to identify chimaeric chromosomes by the technique of pulsed field gradient gel electrophoresis.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Swartz D. C., Cantor C. R.* Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis // *Cell.*—1984.— **37**, N 1.— P. 67—75.
2. *Carle G. F., Olson M. V.* Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis // *Nucl. Acids Res.*—1984.— **12**, N 14.— P. 5647—5664.
3. *Chimeric plasmids for cloning of deoxyribonucleic sequences in Saccharomyces cerevisiae* / P. K. Storms, J. B. McNeil, P. S. Khandekar et al. // *J. Bacteriol.*—1979.— **140**, N 1.— P. 73—82.
4. *Nagley P., Linnane A. W.* Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1970.— **39**, N 5.— P. 989—996.
5. *Van Ommen G. J. B., Verkerk J. M. H.* Human genetics diseases, a practical approach.— New York: IRL press, 1986.— 133 p.
6. *Carle G. F., Olson M. V.* An electrophoretic karyotype for yeast // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.— **82**.— P. 3756—3760.
7. *Johnston J. R., Mortimer R. K.* Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeast // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1986.— **36**, N 4.— P. 569—572.
8. *Генетическое изучение интеграции плазмид в дрожжевые хромосомы. Сообщ. IV. Интеграция плазмиды pYF91 в различные хромосомы дрожжей / Б. Ф. Яровой, В. П. Степанова, С. А. Булат, и др. // Генетика.*—1987.— **23**, № 3.— С. 431—439.

Ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова
АН СССР, Ленинград
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Ин-т общей генетики им. Н. И. Вавилова,
АН СССР, Москва

Получено 23.08.89