

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
Інститут клітинної біології та генетичної  
інженерії

---

На правах рукопису  
УДК 577.21+577.152.5

Стороженко  
Сергій Володимирович

**ЕКСПРЕСІЯ ТА ІМПОРТ ДНК-ТОПОІЗОМЕРАЗИ ТИПУ II  
DROSOPHILA MELANOGASTER В КЛОРОПЛАСТИ ТРАНСГЕННИХ  
РОСЛИН NICOTIANA TABACUM.**

03.00.25 - "клітинна біологія"

Автореферат  
дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

Роботу виконано у відділі цитофізіології та клітинної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії АН України.

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00777826 (.)

Науковий керівник - академік АН України  
В.Ю. Глеба

Офіційні опоненти: - доктор біологічних наук  
С.М. Храпунов

доктор біологічних наук  
Б.О. Левенко

Провідна організація - Інститут молекулярної біології та генетики АН України.

Захист відбудеться 18 березня 1994 р. о 14 год на засіданні спеціалізованої ради Д.01.19.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

з дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту.

Автореферат розіслано 15 лютого 1994 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук

В.В. Малишев

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

Актуальність проблеми. ДНК-топоізомерази - це особлива група ферментів, які шляхом уведення двоцланцюгових (топоізомерази типу II) або одноцланцюгових (топоізомерази типу I) розривів здатні індукувати в молекулах ДНК топологічні переходи, такі як суперпіралізація-релаксація, катенування-декатенування, завузлення-розвузлення. Як правило, такі переходи є результатом розв'язання топологічних проблем, що виникають при всіх природних процесах клітинного метаболізму ДНК, що потребують розплетення ланцюгів. Отже, ДНК-топоізомерази беруть участь у процесах реплікації, транскрипції, транспозиції, рекомбінації та деяких інших (Voarberg, 1985). Крім того, ДНК-топоізомерази самі здатні індукувати незаконну рекомбінацію *in vitro* та *in vivo* (Ikeda, 1989). З іншого боку, вони підвищують стабільність геному за допомогою релаксації негативних супервітків (Wang, 1990). Не дивлячись на те, що властивості ДНК-топоізомераз досить добре вивчені *in vitro*, роль цих ферментів *in vivo* зараз вивчається, і дослідникам ще дуже далеко до повного її розуміння. Це особливо стосується питань участі ДНК-топоізомераз у регуляції експресії генів за допомогою змінення топології ДНК.

Тому, отримання трансгенних організмів, в яких експресується додаткова чужирідна топоізомераза, є важливим та актуальним завданням. Порушення балансу топоізомераз може призвести до порушень в експресії генів, ініціації подій незаконної рекомбінації, результатом якої є виникнення делецій і перебудов у молекулі ДНК. У зв'язку з цим, рослини являють собою модельні системи особливого типу, тому що крім геному та мітохондріону, їх клітини містять і пластом. Основним підходом, який використовують для змінення генетичного апарату хлоропластів, є генетична трансформація. Проте, існує ряд проблем, які роблять пряму генетичну трансформацію процедурою надто складною та малоефективною.

Не менш важливим, але простішим та більш ефективним підходом до змінення генетичного апарату хлоропластів є та, звана "білкова трансформація" цих органел. Цей метод дозволяє увести в хлоропласти не гени, а продукти їх експресії з використанням природньої системи імпорту білків у хлоропласти. Якщо такими білками будуть ДНК-модифікуючі білки, такі як рестриктази та відповідні їм метилази, зворотні транскриптази, рекомбінази, ДНК-топоізомерази та інші, то можна чекати виникнення змін генетичного апарату хлоропластів без прямої трансформації.

ДНК-топоізомерази є ферменти, які, з точки зору використання їх у ролі чужирідних ДНК-модифікуючих білків, викликають безпечний інтерес завдяки притаманним їм вже згаданим вище властивостям. Отже, отримання трансгенних рослин, які імпортують у строму хлоропластів ДНК-топоізомеразу II дрозофіли, є намаганням, з одного боку, використати цей фермент для впливу на генетичну систему хлоропластів, з другого боку, створити модельну систему для вивчення властивостей ДНК-топоізомераз *in vivo*.

Крім того, такою модельною системою можуть бути і трансгенні рослини з потужною конститутивною експресією гену чужирідної ДНК-топоізомерази. В цьому випадку, фермент, що експресується, буде діяти на генетичну систему ядра.

Мета та завдання роботи. Метою цієї роботи було вивчення експресії ДНК-топоізомерази типу II дрозофіли в трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum* і дослідження імпорту топоізомерази II дрозофіли в строму хлоропластів трансгенних рослин тютюну.

До конкретних завдань роботи входило:

1. Розробка та створення конструкції для конститутивної експресії гену ДНК-топоізомерази типу II в клітинах вищих рослин.
2. Розробка та створення конструкції для експресії та імпорту *in vivo* ДНК-топоізомерази II дрозофіли в строму хлоропластів.
3. Трансформація рослин тютюну створеними конструкціями та селекція трансгенних рослин.
4. Молекулярно-біологічний аналіз селектованих трансформантів з метою доведення їх трансгенності, експресії уведених конструкцій та імпорту продукту експресії в хлоропласти.

Наукова новизна та практична цінність роботи. Вперше отримано трансгенні рослини тютюну, що експресують ген ДНК-топоізомерази типу II дрозофіли під контролем конститутивного промотора. Вперше отримано трансгенні рослини тютюну, що імпортують ДНК-топоізомеразу типу II дрозофіли в строму хлоропластів. Вперше показано, що трансгенні рослини тютюну, які експресують та імпортують ДНК-топоізомеразу II дрозофіли в хлоропласти, характеризуються певними аномаліями в будові квіток.

Розроблено пару універсальних праймерів і підібрано умови для ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції послідовності 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти, що дозволяє проводити швидкий та високочутливий аналіз практично

будь-яких трансгенних рослин, що містять у геномі 35S промотор.

Отримані трансгенні рослини являють собою цікаві модельні системи для вивчення ролі ДНК-топоізомерази II в регуляції експресії генів, процесів рекомбінації та підтримання стабільності геному, для дослідження різних аспектів імпорту білків у хлоропласти та ядра вищих рослин.

Результати роботи використовуються при читанні спецкурсу з молекулярної біології та генетичної інженерії рослин на кафедрі клітинної біології та генетичної інженерії Київського університету.

Апробація роботи. Результати роботи подавались на 6-му Європейському конгресі з біотехнології (Флоренція, червень 1993), на II Російському симпозиумі "Нові напрями біотехнології рослин" (Пушино, травень 1993), на Конференції з генетики соматичних клітин у культурі (Москва, листопад 1993), а також на наукових семінарах відділу цитофізіології та клітинної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії АН України.

Структура та об'єм роботи. Дисертація включає в себе вступ, огляд літератури, матеріали та методи, результати та обговорення, заключну частину, висновки та список літератури, що містить 260 бібліографічних посилань, 264 з яких іноземні. Роботу викладено на 137 сторінках машинопису, робота включає 16 малюнків, серед яких 16 фотографій.

#### Матеріали та методи.

Плазміда pGFC-1, що несе ген ДНК-топоізомерази II дрозопли була люб'язно надана др. Хсіехом (США), pGatneo2, що містить послідовність транзитного пептиду гену малі субодиниці рибулосо-1,5-бісфосфаткарбоксілази гороху, подарована др. Ван Монтагю (Бельгія).

Для клонування використовували штам E. coli JM101. Для трансформації рослин брали штам A. tumefaciens C58C1 (pMP90). Об'єктом трансформації був тютюн N. tabacum SR-1.

При створенні конструкцій використовували рестриктази та ДНК-модифікуючі ферменти фірми "Ферментас" (Литва).

Визначення первинної структури ДНК проводили за методом Сенгера (Sanger et al., 1977) з використанням T7-полімерази (секвеннази).

Трансформацію рослин проводили за методом листових дисків

(Horsch et al., 1985). Селекцію трансформантів вели на середовищі з канаміцином у концентрації 100 - 200 мг/л.

Наявність продукту експресії гену *prtII* у трансгенних рослинах визначали за допомогою відповідних поліклональних антитіл за методом ELISA з використанням набору *NPTII ELISA Kit* фірми "5-Prime - 3-Prime, Inc." (США).

Ампліфікацію ДНК *in vitro* провели за допомогою ДНК-ампліфікатора ААГ-88 (НВО "Прогрес", Україна).

Сумарну рослинну ДНК виділяли за стандартною методикою (Murphy and Thompson, 1980), сумарну РНК - за методом, що запропонував Кірк (Kirk et al., 1985).

Саузерн- і нозерн-блот-гібридизації вели на нейлонових фільтрах за метою Чач та Гілберта (Church and Gilbert, 1984). Для зондів фрагменти ДНК мітили  $^{32}P$  за допомогою набору *Random Primed DNA Labelling Kit* ("Boehringer Mannheim", ФРН).

Ядерні та хлоропластні білкові екстракти готували за методикою, які викладено у Дрейпера та інш. (1991). Білки фракціонували за допомогою диск-електрофореза у 8% поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (Laemmli, 1970).

Вестерн-блотинг проводили за методикою, яку було описано раніше (Burnette, 1981).

#### Результати та обговорення.

##### 1. Створення конструкцій для експресії та імпорту ДНК-топоізомерази II дрозофіли в хлоропласти тютюну.

Для експресії топоізомерази типу II дрозофіли використовували відповідну кДНК, клоновану у складі плазміди *pgFc-1*. За допомогою пакету програм *GENE* було побудовано детальну рестрикційну карту гену з метою пошуку сайтів зручних для клонування. Часткову рестрикційну карту гену показано на мал. 1А. Єдиним зручним сайтом для вирізання гену є сайт *BamHI*, розташований на 84 нуклеотида нижче стартового АТГ-кодону гену. Цей сайт використовували для вирізання структурної частини гену з боку 5'-кінця та *BamHI*-сайт полілінкера - з 3'-кінця.

Вищезгаданий *BamHI*-фрагмент структурного гену клонували у *BamHI*-сайті касети експресії *pRT103*. Цей вектор містить послідовності 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти та термінатора анскрипції того ж вірусу, що розділені полілінкером з рядом

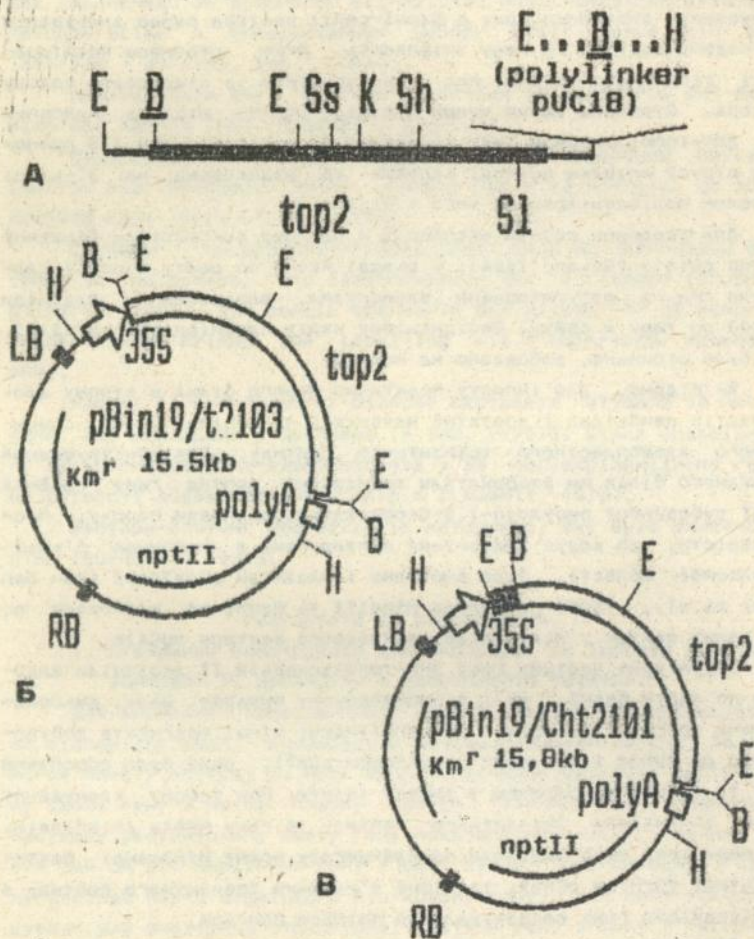
унікальних сайтів рестрикції. У складі NcoI-сайту вектор має стартовий ATG-кодон, оточений консенсусною послідовністю зв'язування малої субчастки еукаріотичної рибосоми (Kozak, 1986). При клонуванні фрагмента гену в BamHI-сайті вектора рамки зчитування ATG-кодону вектора та гену збігаються. Отже, отримана послідовність гібридного білка має транлюватися із стартового кодону вектора. Отримана таким чином плазмідна рt2103 містить неповний ген ДНК-топізомерази типу II дріозофіли під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної калусту та фланкована на 3'-кінці сигналом поліаденілювання того ж вірусу.

Для уведення касети експресії в рослину використали бінарний вектор pBin19 (Bevan, 1984), у складі якого по сайту NipdIII клонували ген з регуляторними елементами, вирізаний з плазмиди рt2103 по тому ж сайту. Рестрикційну карту плазмиди pBin19/t2103, яку було отримано, зображено на мал.1Б.

Як відомо, для імпорту практично любого білка в строму хлоропластів необхідна і достатня наявність на N-кінці білка специфічного хлоропластного транзитного пептиду. Для конструювання гібридного білка ми використали транзитний пептид гену gbcS-3A малої субодиниці рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксілази гороху. Послідовність, що кодує транзитний пептид гену з частиною 5'-нетранслюємої області, було вирізано з плазмиди pGse1neo2 (Van den Broek et al., 1985) по сайтах HindIII та BamHI та клоновано по тих самих сайтах у полілінкері фугмідного вектора pUC118.

Структурну частину гену ДНК-топізомерази II дріозофіли вирізали по сайту BamHI, як і в попередньому випадку. Далі, використовуючи фрагмент Кленова, 5'-виступаючі кінці фрагмента добудували до тупих і лігували з вектором pCht1, який було оброблено SmaI та лужною фосфатазою з тинусу теляти. При такому клонуванні рамки зчитування транзитного пептиду та гену мають збігатися. Для перевірки цього виділяли одностандову форму отриманої рекомбінантної фугмиди pCht2, та місце з'єднання транзитного пептиду з послідовністю гену секвенували за методом Сенґера.

Для установлення гену гібридного білка під контроль 35S промотора використали касету експресії pRT101. На відміну від касети pRT103, у цьому векторі власний стартовий кодон відсутній, і в цьому випадку трансляція буде починатися з ATG-кодону послідовності, що кодує гібридний білок. Вектор pRT101 розщеплювали рестриктазою EcoRI, за допомогою фрагмента Кленова, добудували



Мал.1. А - часткова рестрикційна карта вставки плазмиди pGFC-1, що містить кДНК топоізомерази типу II дрозофіли. Б - рестрикційна карта плазмиди pBin19/t2103. В - рестрикційна карта плазмиди pBin19/Cht2101. Н - HindIII, Е - EcoRI, В - BamHI, К - KpnI, Sh - SphI, S1 - SalI, Ss - SetI. Чорним прямокутником показано послідовність хлоропластного тоанізтного пептиду.

5'-виступаючі кінці до тупих і обробляли лужною фосфатазою. Послідовність гібридного білка вирізали з плазміди pCht2 по сайтах HindIII і SmaI та аналогічно добудовували 5'-виступаючий кінець до тупого. Потім проводили лігування вектора і послідовності гібридного білка. Отримана в результаті лігування плазміда pCht2101 містила ген гібридного білка під контролем 35S промотора, фланкований з 3'-кінця послідовністю термінатора вірусу мозаїки частної капусти.

Нарешті, послідовність, що кодує гібридний білок, разом з контролюючими елементами вирізали по сайту HindIII з плазміди pCht2101 та клонували по тому ж сайту у складі бінарного вектора pBin19. Карту плазміди pBin19/Cht2101 зображено на (мал. 1В.)

## 2. Трансформація рослин тютюну.

Плазміди pBin19/t2103 та pBin19/Cht2101 мобілізували в штам агробактерій за допомогою трибатькіського зхрещування. Із клонів, стійких до канаміцину та ріфампіцину, виділяли плазміди та перевіряли за допомогою рестрикційного аналізу (дані не наведені).

Отриманими штамми агробактерій інфікували листові диски тютюну. Селектували 39 клонів, що стійкі до канаміцину в концентрації 100 - 200 мкг/мл після трансформації pBin19/t2103 та 53 - у випадку трансформації pBin19/Cht2101. Як позитивний контроль використовували трансформацію за допомогою того ж самого штаму агробактерій, що містить немодифікований вектор pBin19.

Із отриманих стійких до канаміцину клонів, регенерували диференційовані рослини та висаджували в ґрунт для культивування та подальшого аналізу.

## 3. Докази трансгенності селектованих після трансформації рослин тютюну.

Через те що конструкції, якими трансформували рослини, містять маркерний ген nptII, першим етапом аналізу рослин, які, як ми припустили, є трансгенними, було визначення в них вмісту продукту експресії гену за допомогою поліклональних антитіл. Довільним чином ми відібрали по декілька клонів, отриманих після трансформації конструкціями. З відібраних клонів виділяли білковий екстракт і проводили реакцію ELISA з антитілами проти неоміцинофосфотрансферази. В результаті виявилось, що усі 5 клонів, які отримано після трансформації pBin19/t2103, та всі 4 клони, що

отримано після трансформації рВін19/Сht2101, містять неоміцинфотрансферазу II. У контрольних нетрансформованих рослин суттєвої реакції з антитілами виявлено не було. Ці дані свідчать про наявність експресії уведеного гену nptII в усіх лініях рослин, що проаналізовано.

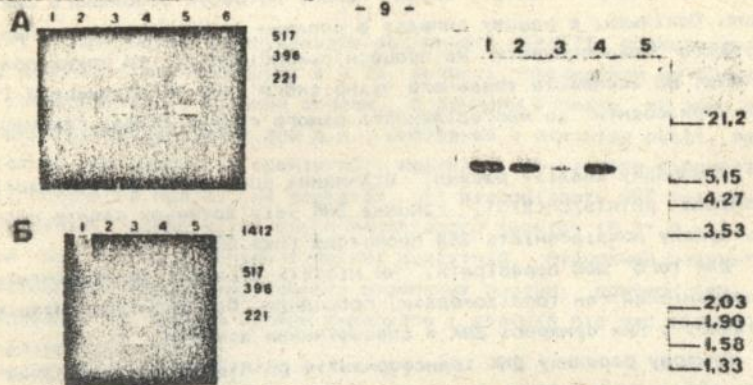
Оскільки ампліфікація ДНК in vitro за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є відносно простим і надзвичайно чутливим методом, ми вирішили використати його для аналізу отриманих трансформантів. Оскільки в наших конструкціях, а також у більшості інших генно-інженерних конструкцій використовують 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, ми вирішили підібрати пару праймерів для ампліфікації частини послідовності промотора. Це дозволяє, по-перше, проаналізувати трансгенні рослини, які отримано після трансформації як однією, так і іншою конструкціями, з використанням лише однієї пари праймерів, по-друге, ці праймери можна використовувати і в усіх інших випадках, якщо уведені гени містять 35S промотор. В результаті аналізу послідовності промотора для праймерів було обрано такі послідовності довжиною в 21 нуклеотид:

5'-TCATTGCGATAAAGGAAAGGC-3' - позиції -372 -393,

5'-TTGCGAAGGATAGTGGGATTG-3' позиції -208 -227 по "+" - ланцюгу промотора. При такому підборі затравок довжина продукту ампліфікації складає 189 п.н.

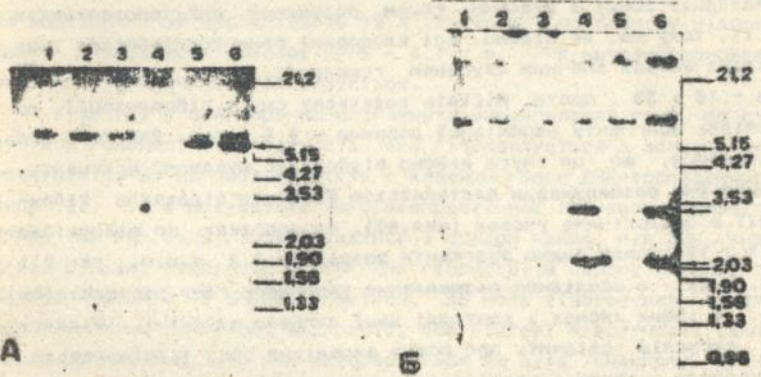
Для проведення аналізу з відібраних клонів виділяли сумарну ДНК і проводили реакцію ампліфікації.

Результати аналізу трансгенних рослин за допомогою ампліфікації показано на мал.2А. Як видно з малюнка, у випадку аналізу трансформантів, отриманих після трансформації конструкцією рВін19/с2103, лише дві (19 і 23) з п'яти проаналізованих стійких до канаміцину ліній дають фрагмент очікуваного розміру після проведення реакції ампліфікації. Відсутня також і ампліфікація ДНК контрольної нетрансформованої рослини. Із отриманих результатів можна зробити висновок, що, не дивлячись на експресію гену nptII, три із отриманих ліній не зніщують послідовність 35S промотора, отже, Т-ДНК інтегрувала не повністю у склад геному, або випадіння послідовності промотора трапилося після інтеграції в результаті подій незаконної рекомбінації. Очевидно, ці лінії не є особливо цікавими з точки зору мети даної роботи, оскільки вони наперед не експресують уведений ген топоізомерази. Проте, факт нестабіль-



Мал.2. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації ДНК трансформованих рослин тютюну. А - конструкцією рВін19/t2103, 1,2,3,4,5 - ДНК клонів 2,15,19,21,23, відповідно, 6 - ДНК нетрансформованої рослини; Б - конструкцією рВін19/Сht2101, 1 - ДНК нетрансформованої рослини, 2,3,4,5 - ДНК клонів 42, 201, 207, 208, відповідно.

Мал.3. Результати Саузерн-блотинг-гібридизації HindIII-перевару сумарної ДНК ліній тютюну, трансформованих рВін19/Сht2101, з послідовністю хлоропластного транзитного пептиду. 1 - ДНК нетрансформованої рослини; 2,3,4,5 - лінії 42, 201, 207, 208, відповідно.



Мал.4. Блотинг-гібридизація за Саузерном сумарної ДНК ліній тютюну, які отримано після трансформації рВін19/t2103, з 4,7 т.п.н. BamHI-фрагментом гену ДНК-топоізомерази II дрозофіли. А - ДНК обробляли рестриктазою HindIII. 1 - ДНК нетрансформованої рослини, 2,3,4,5,6 - ДНК ліній 2,15,21,19,23, відповідно. Стрілкою позначено 5,5 т.п.н. фрагмент, що містить перенесений ген з регуляторними елементами. Б - ДНК обробляли рестриктазою EcoRI. 1 - ДНК нетрансформованої рослини, 2,3,4,5,6 - лінії 2,15,19,21,23, відповідно. Стрілками позначено 3,2 т.п.н. і 2,1 т.п.н. фрагменти уведеного гену.

ності чужирідних генів у складі геному потребує особливого вивчення. Оскільки, в нашому випадку в рослині уводився ген, експресія якого може впливати на процеси рекомбінації, то можна припустити, що експресія уведеного чужирідного гену топоізомерази II може призводити до нестабільності самого гену у складі геномної ДНК.

У випадку аналізу рослин, отриманих внаслідок трансформації плазмидою pBin19/Cht2101, геномна ДНК усіх чотирьох клонів містить шукану послідовність 35S промотора (мал.25)

Для того щоб перевірити, чи містять отримані трансформанти повнорозмірний ген топоізомерази, проводили блотинг-гібридизацію виділеної з них сумарної ДНК з специфічними зондами.

Сумарну рослинну ДНК трансформантів pBin19/t2103 розщеплювали рестриктазою HindIII, фракціонували електрофорезом у агарозному гелі, переносили на нейлонові фільтри та гібридували з міченим 4,7 т.п.н. BamHI-фрагментом плазмиди pGFC-1, що містить структурний ген топоізомерази. Результати блотинг-гібридизації за Саузерном наведені на мал.4А. Цікаво відзначити, що у всіх п'яти клонах присутній гібридизаційний сигнал, що відповідає фрагменту розміром приблизно 6 т.п.н., це стосується і контрольної нетрансформованої рослини. Ми припустили, що даний сигнал є результатом гібридизації зонду з власним геном рослинної ДНК-топоізомерази типу II, тому що, як відомо, всі клоновані гени топоізомераз типу II відзначаються значним ступенем гомології (Wang, 1987). Два клони - 19 і 23, проте, містять додаткову смугу гібридизації, що відповідає фрагменту необхідної довжини - 5,6 т.п.н. Для того щоб переконатися, що ця смуга дійсно відповідає шуканому фрагменту, рослинну ДНК розщеплювали рестриктазою EcoRI та піддавали гібридизації в аналогічних умовах (мал.4Б). На доріжках, що відповідають 23 і 19 клонам видно фрагменти розмірами 3,2 т.п.н. та 2,1 т.п.н., які є наслідком розщеплення уведеного гену рестриктазою EcoRI. В інших клонах і контролі дані сигнали відсутні. Відсутність сигналів свідчить про повне випадіння гену топоізомерази, який вводили, разом з регуляторними елементами. Ці дані повністю відповідають результатам ПЛР-аналізу. І в цьому випадку, на всіх доріжках видно сигнали, що відповідають власній рослинній послідовності, яка гібридується з зондом.

Для аналізу рослин, отриманих в результаті трансформації конструкцією pBin19/Cht2101, сумарну ДНК, що віділяли з цих лі-

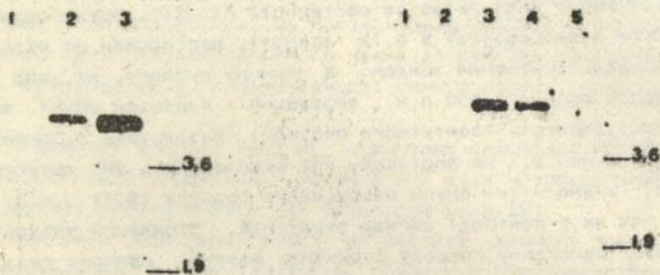
ній, розщеплювали ендонуклеазою рестрикції HindIII, фракціонували за допомогою електрофорезу в 0,7% агарозі, переносили на фільтри і гібридизували з міченим зондом. В данному випадку, як зонд використовували фрагмент 300 п.н., вирізаний з плазміди pCht1, який містить послідовність транзитного пептиду. Результати гібридизації подані на мал.3. На доріжках, які відповідають ДНК трансгенних ліній, видно чіткі смуги необхідного розміру (5,8 т.п.н.), в той же час як у контролі сигнал відсутній. Отриманий результат підтверджує трансгенну природу отриманих рослин, причому ген, що уводили, не зазнав ніяких перебудов і делецій під час або після трансформації.

#### 4. Аналіз експресії уведених генів.

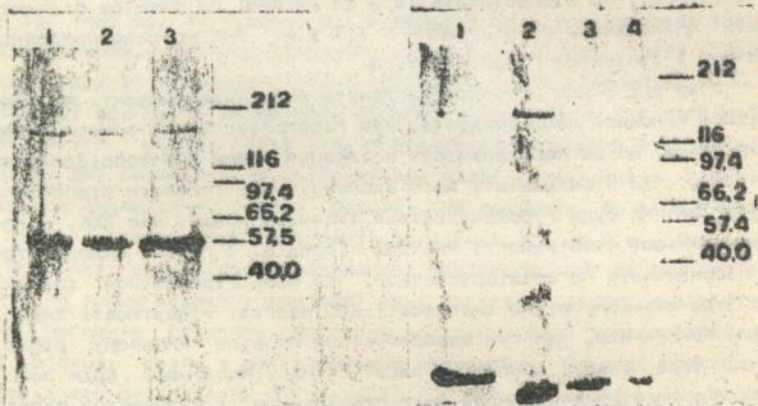
Для вивчення експресії на рівні транскрипції, з 19 і 23 клонів (конструкція pBin19/t2103), що містять ген топоізомерази II дрозофіли під контролем 35S промотора, виділяли сумарну РНК. РНК потім розділяли за допомогою електрофорезу в агарозі в денатуруючих умовах, переносили на фільтри і гібридизували з тим самим зондом, що і у випадку блотинг-гібридизації за Саузерном. Результати нозерн-блотинга показані на мал.5А. Гібридизаційні сигнали на доріжках, що відповідають 19 і 23 клонам, по розміру відповідають очікуваному розміру мРНК - 4,7 т.н. РНК нетрансформованої рослини з зондом не гібридується.

У зв'язку з цим доречно розглянути вищезгаданий факт, що стосується геномної послідовності, яка гібридується з зондом. Якщо припустити, що ця послідовність є власним геном ДНК-топоізомерази типу II, то в результаті його експресії має існувати відповідна мРНК. Ця РНК буде гібридуватися з зондом краще, ніж ДНК, внаслідок більшої стабільності РНК-ДНК гібридів. В нашому випадку така гібридизація не спостерігається, що може відбуватися завдяки або дуже низькому рівню експресії, або взагалі відсутності такої. Можна припустити, що ген експресується на дуже низькому рівні, хоча, така слабка експресія здається малоімовірною. Крім того, виявлена послідовність може бути псевдогеном. У будь-якому випадку, наведений факт здається цікавим і, на наш погляд, потребує більш детального вивчення.

Аналогічний аналіз проводили і з лініями, отриманими після трансформації конструкцією pBin19/Cht2101. Як зонд використовували той самий 4,7 т.п.н. BamHI-фрагмент гену. Результати гібриди-



Мал. 5. Результати нозерн-блотинг-гібридизації сумарної РНК трансгенних ліній тютюну, з 4,7т.п.н. ВаМНІ-фрагментом гену *top2*. А - трансформація рВіп19/т2103. 1 - РНК нетрансформованої рослини; 2,3 - РНК ліній 19,23, відповідно. Б - трансформація рВіп19/Сht2101. 1 - РНК нетрансформованої рослини; 2,3,4,5 - РНК ліній 42, 201,207,208, відповідно.



Мал. 6. Результати імуно-блотингу білкових екстрактів трансгенних рослин тютюну з поліклональними антитілами проти ДНК-тополоізомерази типу II дрософіли. А - ядерні екстракти трансформантів рВіп19/т2103. 1 - нетрансформована рослина; 2,3 - 19 і 23 клони, відповідно. Б - хлоропластні екстракти трансформантів рВіп19/Сht2101. 1,2 - клон 201 і 207, відповідно; 3 - 19 клон (трансформація рВіп19/т2103); 4 - нетрансформована рослина.

зації показані на мал.5Б. Тільки дві лінії - 201 и 207 експресують уведений ген, що виявляється в появі смуги гібридизації розміром 5,0 т.н., яка відповідає повнорозмірній мРНК. У двох інших лініях експресія практично не виявляється, принаймні, на рівні чутливості методу.

Останнім етапом аналізу експресії уведеного чужирідного гену є ідентифікація білкового продукту експресії. Для цього було використано метод імуноблотингу.

З 19 і 23 клонів (pBin19/t2103) виділяли ядра, лізували їх, і ядерний білковий екстракт фракціонували за допомогою денатуруючого диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі. Потім, білки переносили на нітроцелюлозні фільтри та обробляли препаратом поліклональних антитіл кроля проти ДНК-топоізомерази типу II дрозофіли. Для детекції комплексів антиген-антитіло використовували другі антитіла проти імуноглобулінів кроля, що кон'юговані з пероксидазою хрину. Результати аналізу показані на мал.6А. На всіх трьох доріжках видно цілком ідентичні смуги. Серед цих смуг присутня і смуга з молекулярною масою порядку 180 кДа, що відповідає молекулярній масі чужирідної топоізомерази, яка експресується. Така смуга є і на доріжці, що відповідає ядерним білкам контрольної нетрансформованої рослини. Імовірно, що ця смуга є результатом зв'язування антитіл з власною ДНК-топоізомеразою II тютюну. В цьому випадку, не виявляється можливим відрізнити власний фермент від чужирідного і необхідно скористатися іншим методом фракціонування білків, наприклад, методом двомірного електрофорезу. Отриманий результат можна пояснити і тим, що уведений ген не транслюється, або продукт трансляції не потрапляє в'ядро. Оскільки, вектор pRT103, на основі якого зроблено конструкцію, оптимізовано для трансляції, а тваринні сигнали для імпорту в ядро спрацьовують у рослинах, то ми вважаємо більш імовірним наше перше припущення про близькість молекулярних мас чужирідного та власного ферментів.

Достатньо інтенсивні смуги з більш низькою молекулярною масою, скоріше за все, є результатом неспецифічної реакції антитіл з рослинними білками.

Для перевірки, чи імпортується ДНК-топоізомераза II дрозофіли в хлоропласти трансгенних рослин тютюну, отриманих після трансформації pBin19/Cht2101, із листків клонів 201 і 207 виділяли хлоропласти, обробляли їх трипсином, потім лізували. Отриманий

білковий екстракт піддавали вестерн-блот-аналізу в тих самих умовах, як і у випадку з трансформантами рВін19/т2103. Результати вестерн-блотингу показано на мал.65. На доріжках, що відповідають фракціонованим хлоропластним білкам трансгенних клонів видно смуги масою порядку 160 кДа, які відповідають ДНК-тополомеразі II дрозофіли. У хлоропластних білкових лізатах контрольної нетрансформованої рослини та 23 клону (рВін19/т2103) такі відсутні. Отриманий результат однозначно говорить про те, що уведений химерний ген не тільки експресується, але продукт експресії імпортується в хлоропласти. Попередня обробка хлоропластів трипсином повністю виключає можливість зв'язування попередника з рецептором зовнішньої мембрани без наступного імпорту всередину хлоропласта.

#### 5. Фенотип отриманих трансгенних рослин.

Фенотип трансгенних рослин вивчався після висаджування їх у ґрунт на протязі всього періоду вегетації. Як після трансформації конструкцією рВін19/т2103, так і після трансформації рВін19, Сht2101 трансгенні рослини мали фенотип, який нічим не відрізнявся від фенотипу вихідних рослин. Проте, цвітіння трансформантів рВін19/т2103 настало приблизно на місяць пізніше, у порівнянні з контрольними рослинами і трансформантами рВін19. Крім того, квітки трансформантів рВін19/т2103 мали злегка деформовані пелюстки та вкорочену маточку. Було б логічним зв'язати ці фенотипічні зміни з експресією уведеного гену топоімеразі. Але для цього необхідно перевірити успадкування цих ознак, що не входить в мету цієї роботи.

Ніяких аномальних явищ у розвитку та цвітінні рослин-трансформантів рВін19/Сht2101 ми не виявили. Проте, деякі квітки клонів 201 і 207 мали дефектні тичинки, у котрих з пильця розвивалася пелюстка. Кількість таких тичинок у квітці складала від 1 до 3. 7 квіток із 26-ми квіток клону 201 мали таку ознаку і 3 із 31-ої квітки клону 207 також мали дефектні тичинки. У кожній з 52 квіток контрольної нетрансформованої рослини, 37 квіток трансформанту рВін19, 87 квіток клонів-трансформантів рВін19/т2103 такі структури не виникали. Хоча приведені дані не є статистично достовірними, можна стверджувати, що виникнення дефектних тичинок якимось чином пов'язано з імпортом чужирідної ДНК-топоімеразі II у хлоропласти.

Висновки.

1. На основі вектора рВін19 створено конструкцію для експресії ДНК-топоізомерази типу II дрозофіли в клітинах рослин, що містить структурний ген ферменту під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти.

2. На основі вектра рВін19 з використанням послідовності хлоропластного транзитного пептиду малої субодиниці риб. ло-зо-1,5-бісфосфаткарбоксилази гороху створено конструкцію для експресії та імпорту ДНК-топоізомерази II дрозофіли в хлоропласти вищих рослин.

3. Отримано трансгенні рослини *Nicotiana tabacum*, що експресують ДНК-топоізомеразу II дрозофіли. Експресію уведеного гену доведено на рівні транскрипції. Квітки трансгенних рослин характеризуються деякими фенотипічними відмінностями від таких у контрольних нетрансформованих рослин.

4. Отримано трансгенні рослини тютюну, що імпортують ДНК-топоізомеразу типу II дрозофіли в хлоропласти. Експресію химерного гену показано на рівні транскрипції, білковий продукт ідентифіковано в хлоропластах трансгенних рослин.

5. Імпорт топоізомерази II дрозофіли в хлоропласти тютюну пов'язаний з виникненням аномалій у розвитку тичинок квіток трансгенних рослин.

6. У геномі *Nicotiana tabacum* виявлено послідовність, що гібридується з геном ДНК-топоізомерази типу II дрозофіли. Ця послідовність, можливо, є геном або псевдогеном рослинної ДНК-топоізомерази типу II.

7. Розроблено умови та підібрано пару зручних праймерів для ампліфікації *in vitro* послідовності 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти, що дозволяє проводити швидкий і високочутливий скринінг трансгенних рослин, які трансформовано будь-якою конструкцією з 35S промотором.

Список робіт, що опубліковано по темі дисертації.

1. Стороженко С.В., Шиша Е.Н., Ілеба Ю.Ю. Трансформація рослин *Nicotiana tabacum* геном ДНК-топоізомерази II типу *Drosophila melanogaster* // Біополімери і клітина.-1993.-9, N 1.-С.82-87.

2. Стороженко С.В. Аналіз трансгенних рослин за допомогою ПЛР: пара універсальних праймерів для ампліфікації послідовності

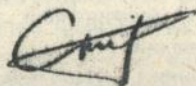
358 промотора // Біополімери і клітина.-1994.-10, N 1.-С.65-68.

3. Стороженко С.В., Шиша Е.Н., Глеба Ю.Ю. Получение и анализ трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих ген ДНК-топоизомеразы II типа *Drosophila melanogaster* // II Российский симпозиум "Новые методы биотехнологии растений". Тез. докл. (Пушино, 1993г).-Пушино, 1993.-С.53.

4. Стороженко С.В., Шиша Е.Н., Глеба Ю.Ю. In vivo импорт ДНК-топоизомеразы II типа *Drosophila melanogaster* в хлоропласты *Nicotiana tabacum* // Конференция по генетике соматических клеток в культуре. Тез. докл. (Черноголовка, 1993).- Москва, 1993.- С.73.

5. Стороженко С.В., Шиша Е.Н., Глеба Ю.Ю. Импорт ДНК-топоизомеразы II типа *Drosophila melanogaster* в хлоропласты трансгенных растений *Nicotiana tabacum* // Цитология и генетика.-1994.-28, N3.- (в печати).

6. Storozhenko S.V., Shisha E.N., Rudenko G.N., Gleba Yu.Yu. Transformation of plant *Nicotiana tabacum* with a gene coding for DNA topoisomerase II type from *Drosophila melanogaster* // 6-th European Congress on Biotechnology. Abstract books (Florence, 1993).-Florence, 1993.-IV.-P.173.



---

Підп. до друку 24.1.94 . Формат 60x84/16. Папір друк. Офс. друк.  
Ум. друк. арк. 0,93. Ум. фарбо-відб. 0,93 . Обл.-вид. арк. 0,8  
Тираж 100 пр. Зам. 22 Безкоштовно.

---

Віддруковано в Інституті математики АН України  
252601 Київ 4, ІСП, вул. Терещенківська, 5

461246

AB 29.420