

На правах рукопису

ЗАЄЦЬ ОЛЕКСІЙ ІВАНОВИЧ

**КЛОНУВАННЯ ГЕНА СТІЙКОСТІ ДО ГЕРБИЦИДУ ВІАЛАФОСУ ТА СТВОРЕННЯ  
ЕКСПРЕСУЮЧИХ КОНСТРУКЦІЙ ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН**

03.00.15 - генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук.

Київ - 1994



00755958 (\$)

AB 31.227

ті фізіології рослин і генетики

Наукові керівники:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
Левенко Борис Олексійович  
кандидат біологічних наук Стехін Ігор Миколайович

Офіційні опоненти:

1. доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України,  
професор Мацелюх Богдан Павлович  
2. кандидат біологічних наук Окунев Олег Володимирович

Провідна організація:

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії  
НАН України

Захист відбудеться "10 листопада" 1994 р. на засі-  
данні спеціалізованої вченої ради Д 016.57.01, при Інституті фі-  
зіології рослин і генетики НАН України

Адреса 252022, м.Київ-22, вул.Васильківська, 31/17

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізі-  
ології рослин і генетики НАН України

Автореферат розісланий "5 жовтня" 1994 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Труханов В.А.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. В сучасному інтенсивному аграрному господарстві використовується велика кількість хімічних препаратів, які виконують функції захисту рослин від бур'янів, фітопатогенних грибів та бактерій і шкідливих комах. Гербіциди складають невід'ємну частину сільськогосподарського виробництва і вносять значний вклад в економіку.

Останнім часом, в зв'язку з загостренням проблеми захисту навколишнього середовища, особлива увага надається гербіцидам нового класу. Дані гербіциди поєднують в собі високу ефективність, низьку токсичність для теплокровних і швидку деградацію в ґрунті. Гербіциди нового покоління діють в основному на такі унікальні для рослин процеси, як фотосинтез та біосинтез незамінних амінокислот. Оскільки ці процеси подібні як у сільськогосподарських рослин так і у конкуруючих з ними бур'янів, більшість гербіцидів являються неселективними. Інтенсивне застосування гербіцидів широкого спектру дії в сільському господарстві можливе лише завдяки одержанню таких форм культурних рослин, які б були стійкими до відповідних гербіцидів.

Існує ряд підходів по вирішенню цієї проблеми. Серед них необхідно виділити генно-інженерний підхід, який передбачає передачу в рослини та експресію в них генів, що визначають стійкість до гербіциду. Створити гербіцидостійкі трансгенні рослини можливо: за рахунок ампліфікації в них генів, що кодуєть фермент - мішень, на який діє гербіцид; за рахунок експресії генів, які кодуєть мутантну форму ферменту - мішені, нечутливу до дії гербіциду; або шляхом передачі та експресії в рослинах генів детоксикації чи біодеградації гербіциду.

Пошук та вивчення генів, продукти яких здатні вступати в реакції з гербіцидами і перетворювати їх в нетоксичні речовини, а також можливість створення гербіцидостійких трансгенних рослин за рахунок експресії в них таких генів, є на сьогоднішній день актуальною проблемою. Джерелом таких генів можуть бути різні види ґрунтової і неґрунтової мікрофлори, що проявляють природну стійкість до гербіцидів. Так, ген детоксикації гербіциду біалафосу представлений в геномі біалафоспродукуючих стрептоміцетів і визначає їх власну стійкість до синтезуемого гербіциду.

Мета та завдання досліджень. Метою даної роботи було клону-

вання гена детоксикації гербіциду біалафосу (bar) із *Streptomyces hygrosopicus* та створення генно-інженерних конструкцій для передачі і експресії bar гена в рослинах. Відповідно з цим були поставлені наступні завдання:

1. Клонування гена bar, що визначає стійкість до гербіциду біалафосу.

2. Картування та модифікація гена bar.

3. Створення конструкцій під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти для експресії гена bar в клітинах вищих рослин.

4. Трансформація рослин створеними конструкціями та молекулярно-біологічний аналіз одержаних трансформантів.

Наукова новизна та практична цінність роботи. Клоновано ген bar із геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus*, який визначає стійкість даного штаму до біалафосу. На відміну від існуючих даних, клонування проводили безпосередньо в *Escherichia coli* в векторній плазміді pUC-19. Ген bar із *Streptomyces hygrosopicus* надає стійкість до біалафосу клітинам *Escherichia coli* під контролем lac промотора та клітинам *Escherichia coli* і *Agrobacterium tumefaciens* під контролем 35S промотора. Це дозволяє проводити прямий відбір рекомбінантних клонів в яких експресується ген bar на різних етапах роботи, включаючи останній, де ген уже знаходиться в векторі для трансформації рослин в реципієнтному штамі *Agrobacterium tumefaciens*.

Вперше одержані трансгенні рослини гречки, які містять ген стійкості до гербіциду біалафосу.

Передача і забезпечення експресії bar гена в рослинах дасть змогу створити трансгенні рослини, стійкі до неселективних гербіцидів біалафосу та фосфінотріцину, що приведе до широкого застосування цих вискоелективних гербіцидів в сільськогосподарському виробництві.

Ген bar із *Streptomyces hygrosopicus* може також бути використаний як ефективний селективний маркер при створенні генно-інженерних конструкцій для трансформації рослин.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на: конференції молодих учених "Актуальные проблемы физиологии растений и генетики", Київ, 1992 рік; на міжнародній школі "Gene transfer and regulation of their expression in eukaryots", Київ, 1993 рік;

а також на наукових семінарах відділу молекулярної генетики Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 4 роботи.

Структура і об'єм дисертації. Дисертацію викладено на 102 стор. машинописного тексту. Вона складається з вступу, огляду літератури, методичної частини, опису результатів та їх обговорення, заключення і висновків. Роботу ілюстровано 27 малюнками і 1 таблицею. Список цитованої літератури містить 126 джерел.

Положення, які виносяться на захист.

1. Ген *bar* із *Streptomyces hygroscopicus* надає стійкість до біолафосу клітинам *Escherichia coli* під контролем лас промотора.

2. Клітини *Escherichia coli* і *Agrobacterium tumefaciens* набувають стійкість до біолафосу при введенні *bar* гена під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти.

3. Ген *bar* у складі генно-інженерної конструкції з регуляторними послідовностями для експресії в рослинах здатний інтегруватися в геном рослин гречки та тютюну.

#### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

В роботі використовували такі бактеріальні штами: *Streptomyces hygroscopicus*, *Escherichia coli* JM 101, *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 та *Agrobacterium tumefaciens* 3850. Для клонування *bar* гена та створення експресуючих конструкцій використовували плазмідні вектори: pUC 19, pCAMV, pBin 19.

Препарати плазмідних ДНК одержували за допомогою метода, розробленого Бірнбоймом і Долі. Препарати геномних ДНК *Streptomyces hygroscopicus* і *Agrobacterium tumefaciens* виділяли методом з використанням SDS і пронази E. Виділення ДНК із свіжого рослинного матеріалу проводили, використовуючи метод Деллапорта.

Одержання компетентних клітини *Escherichia coli* та трансформацію проводили методом з використанням поліетиленгліколю.

Кон'югацію, необхідну для перенесення рекомбінантної плазміди із *E. coli* в агробактерію, здійснювали за допомогою трибатьківського схрещування.

Молекулярно-біологічний аналіз препаратів плазмідних та геномних ДНК здійснювали за допомогою дот- та блот-гібридизації, використовуючи відомі методики.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

### 1. Створення банку генів геномної ДНК

#### Streptomyces hygrosopicus.

Представники роду *Streptomyces* являються продуцентами більшості антибіотиків. Так відомо, що деякі штами стрептоміцетів являються продуцентами біалафосу і мають природну стійкість до власного антибіотику. Біалафос використовується в сільськогосподарському виробництві як високоєфективний гербіцид широкого спектру дії. Поряд з генами продукції біалафосу (*bar*) в геномі *Streptomyces* розташований ген *bar*, який забезпечує детоксикацію цього гербіциду.

Нами проведено відбір ряду штамів стрептоміцетів на стійкість до гербіциду біалафосу. В результаті був відібраний штам *Streptomyces hygrosopicus*, стійкий до гербіциду біалафосу в концентрації 100 мкг/мл.

Для того, щоб клонувати ген, який визначає стійкість стрептоміцетів до біалафосу був створений банк генів геномної ДНК відібраного штаму *Streptomyces hygrosopicus*.

Звичайно при створенні банку генів геномної ДНК *Streptomyces* використовують вектори, які застосовуються для трансформації реципієнтних штамів стрептоміцетів, наприклад pIJ 699. В цьому випадку забезпечується надійна експресія гена під контролем промотора даного вектора, що гарантує відбір необхідних рекомбінантних клонів. Клонування в *Escherichia coli* має ряд переваг порівняно з клонуванням в стрептоміцетах. Завдяки розробці надійної, високоєфективної системи трансформації для *E. coli* можна одержати більш високий її рівень порівняно з трансформацією штамів стрептоміцетів, що має суттєве значення при створенні повного банку генів. Відбір рекомбінантних клонів можна проводити досить просто на відповідному селективному середовищі. І, на решті, всі подальші операції по модифікації гена зручніше проводити в штаммах *E. coli*. В цьому випадку ген стрептоміцетного походження повинен експресуватися під контролем промотора, який працює в клітинах *E. coli*, наприклад *lac* промотора вектора pUC 19, для того, щоб можна було ідентифікувати необхідні рекомбінантні клони.

Ми вирішили створити банк генів біалафосстійкого штаму

*Streptomyces hygrosopicus* в *Escherichia coli* і перевірити можливість експресії *bar* гена в клітинах *E. coli* під контролем *lac* промотора. Для цього стрептомицети вирощували на протязі 4-х діб в рідкому середовищі YEME з високим вмістом сахарози. Потім одержували препарати високомолекулярної геномної ДНК. Проводили повний гідроліз ДНК рестриктазою *Pst* I і одержані фрагменти клонували в відповідний сайт векторної плазмиди *pUC* 19. Для трансформації використовували штаму *Escherichia coli* JM-101. Рівень трансформації становив  $6 \times 10^7$  кл./мл.

Клонування в штамі *E. coli* JM-101 з використанням такого вектора як *pUC*-19 дає змогу проводити прямий відбір рекомбінантних клонів по забарвленню на середовищі з *Xgal* та *IPTG*.

Після трансформації клітини висівали на LB середовище з ампіциліном в концентрації 100 мкг/мл, *Xgal* та *IPTG* в концентрації 40 мкг/мл. В результаті нами було відібрано близько 5 тисяч рекомбінантних клонів. На наступному етапі необхідно було ідентифікувати серед них ті клони, які містять ген *bar*.

## 2. Ідентифікація *bar* гена в створеному банку генів та його картування.

Ідентифікацію рекомбінантних клонів, які містять ген стійкості до гербіциду біалафосу, ми проводили по експресії *bar* гена під контролем *lac* промотора векторної плазмиди *pUC*-19 на середовищі з гербіцидом. ДНК, вбудована в зсну полілінкера вектора *pUC*-19 може транскрибуватися під контролем *lac* промотора вектора. В штамі JM-101 транскрипція з *lac* промотора може бути індукована ізопропілтіогалактозидом.

Рекомбінантні клони переносили методом реплік на мінімальне середовище з ампіциліном, *IPTG* (40 мкг/мл), як індуктором *lac* промотора та з гербіцидом в концентрації від 1 до 10 мкг/мл. Мінімальне середовище в даному випадку використовували для того, щоб не було зовнішнього джерела надходження глутаміну для бактерій (ферментом-мішенню дії біалафосу являється глутамінсинтетаза).

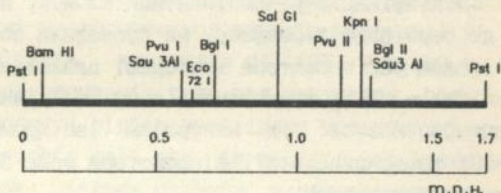
Штаму *E. coli* JM 101 як з плазмідною *pUC*-19 так і без неї резистентний до гербіциду біалафосу в концентрації до 0.5 мкг/мл. Рівень стійкості не підвищувався також за допомогою *IPTG*. Ми відібрали 4 рекомбінантні клони, стійкі до гербіциду біалафосу в кон-

центрації до 5 мкг/мл в присутності IPTG. При відсутності IPTG в селективному середовищі стійкості не виявлялося. Плазмиди, виділені із біолафостійких рекомбінантних клонів, мали додатковий Pst I - фрагмент розміром 1.7 т.п.н..

Отже, ген *bar*, який забезпечує стійкість до гербіциду біолафосу, знаходиться в складі Pst I - фрагмента геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus* розміром 1.7 т.п.н..

Для проведення подальшої роботи по модифікації гена та створенню експресуючих конструкцій з геном *bar* необхідно було побудувати рестрикційну карту фрагмента, який надавав стійкість клітинам *Escherichia coli* до біолафосу. Для цього ми провели рестрикційний аналіз Pst I - фрагмента геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus* розміром 1.7 т.п.н. з використанням ряду рестриктаз. На основі проведеного аналізу побудована рестрикційна карта Pst I - фрагмента геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus* з геном стійкості до гербіциду біолафосу (мал.1). Результати рестрикційного аналізу показали ідентичність Pst I - фрагментів, виділених із рекомбінантних плазмід, що забезпечують стійкість клітинам *E.coli* до біолафосу.

Мал.1. Рестрикційна карта Pst I - фрагмента геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus* з геном стійкості до гербіциду біолафосу.

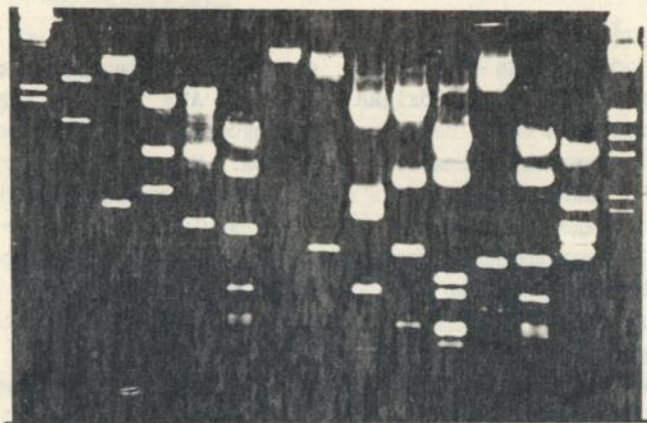


Для визначення орієнтації клонованого фрагмента в векторній плазміді ми провели рестрикційне картування рекомбінантної плазмиди рВА 1 (Pst I - фрагмент геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus* з *bar* геном в векторі рUC 19), яка надає клітинам *E.coli* стійкість до біолафосу в концентрації 5 мкг/мл, з використанням таких же рестриктаз (мал.2). Побудована рестрикційна карта плазмиди рВА 1 (мал.3).

За допомогою метода блот-гібридизації показано, що клонований нами Pst I - фрагмент дійсно належить геномній ДНК *S.*

hygroscopicus.

Отже, нами клоновано Pst I - фрагмент геномної ДНК *Streptomyces hygroscopicus* розміром 1.7 т.п.н., який надає клітинам *Escherichia coli*, експресуючись під лас промотором вектора рUC-19, стійкість до гербіциду біалафосу в концентрації 5 мкг/мл.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Мал.2. Рестрикційний аналіз рекомбінантної плазмиди рВА 1, яка містить Pst I - фрагмент геномної ДНК *Streptomyces hygroscopicus* з геном стійкості до гербіциду біалафосу.

1 - ДНК фага  $\lambda$ , гідролізована рестриктазою Hind III.

Плазміда, гідролізована рестриктазами:

2 - Pst I, 3 - Sal GI, 4 - Pvu I, 5 - Pvu II, 6 - Bgl I,

7 - Bgl II, 8 - Kpn I, 9 - Sal GI + Pvu I, 10 - Sal GI

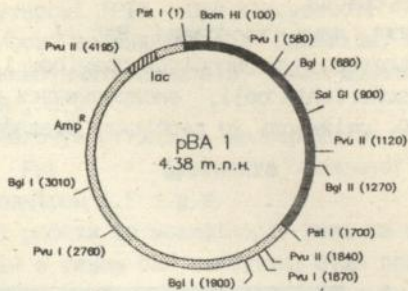
+ Pvu II, 11 - Sal GI + Bgl I, 12 - Sal GI + Bgl II,

13 - Bgl I + Bgl II, 14 - Pvu I + Pvu II.

15 - ДНК фага  $\lambda$ , гідролізована рестриктазами Hind III і

Eco RI.

Мал.3. Рестрикційна карта рекомбінантної плазмідної рВА 1, яка містить Pst I-фрагмент геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus* з геном стійкості до гербіциду білафосу.



### 3. Модифікація bar гена.

Для забезпечення стабільної експресії генів бактеріального походження в рослинах необхідна наявність ATG кодону ініціації трансляції. Для bar гена в *Streptomyces hygrosopicus* кодоном ініціації трансляції являється GTG кодон. Введення в склад bar гена ATG кодона ми провели з використанням штучно синтезованого олігонуклеотида. Виходячи з даних рестрикційного аналізу та нуклеотидної послідовності фрагмента ДНК *Streptomyces hygrosopicus* з геном bar ми знали, що сайт узнавання рестриктази Bam HI знаходиться як на 5'-кінцевій області фрагмента ДНК *Streptomyces hygrosopicus* з геном bar (на відстані 100 п.н. від Pst I сайту), так і в полілінкері вектора pUC-19. Тому ми змогли вирізати Bam HI - фрагмент розміром 1.6 т.п.н. з bar геном із рекомбінантної плазмідної рВА 1 (мал.4). Одержаний таким чином фрагмент був гідролізований рестриктазою Eco 72I. Рестриктаза Eco 72I, сайт узнавання якої знаходиться біля GTG кодону ініціації трансляції bar гена, гідролізує ДНК з утворенням тупих кінців (мал.5). Після рестрикції ми провели електрофорез продуктів гідролізу і елюювали із геля фрагмент ДНК розміром біля 1.1 т.п.н., який мав з одного боку, біля кодону ініціації трансляції, тупий кінець, а з іншого боку - сайт узнавання рестриктази Bam HI.

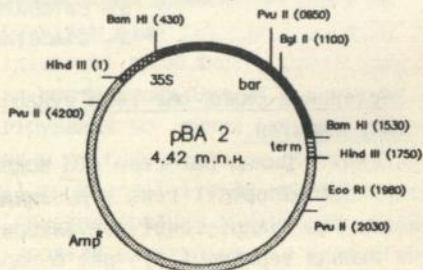
Далі було проведено лігірування по тупих кінцях одержаного фрагмента ДНК з синтезованим олігонуклеотидом розміром 12 п.н., який мав ATG кодон ініціації трансляції і сайт узнавання рестриктази Bam HI (мал.5). Після очистки продукт лігірування гідролізували рестриктазою Bam HI, провели електрофорез в агарозному гелі і елюювали із геля фрагмент ДНК розміром 1.1 т.п.н.. Таким чином, ми одержали Bam HI - фрагмент геномної ДНК *Streptomyces*



bar в відповідний сайт плазмиди pCAMV. Плазміда pCAMV має 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти і Poly A частину гена нопалінсинтетази, які забезпечують експресію генів в еукаріотичних системах, а також маркер стійкості до ампіциліну. Клонуючи фрагмент ДНК в Bam HI-сайт плазмиди pCAMV, ми розміщуємо його між еукаріотичними регуляторними сигналами. Клони, які мають ген детоксикації гербіциду біалафосу, ми відбирали по експресії bar гена в клітинах *Escherichia coli* під контролем 35S промотора на мінімальній середовищі з різними концентраціями біалафосу. Для цього клони переносили методом реплік на мінімальне середовище з ампіциліном і біалафосом в концентрації від 1 до 20 мкг/мл. В результаті були відібрані клони, стійкі до біалафосу в концентрації 10 мкг/мл. Їх стійкість вдвічі вище, ніж стійкість клітин *E.coli* при експресії bar гена під контролем lac промотора вектора pUC 19. Експресія генів бактеріального походження під контролем 35S промотора можлива в *E.coli*, так як відомо, що 5'-проксимальна частина енхансера 35S-промотора має "псевдопромотор" для *E.coli*.

Рекомбінантні плазмиди, виділені із одержаних клонів мали додатковий Bam HI-фрагмент розміром 1.1 т.п.н. ( bar ген) та Hind III фрагмент розміром 1.75 т.п.н. ( bar ген, фланкований еукаріотичними регуляторними послідовностями).

З метою вивчення орієнтації bar гена в векторній плазмиді проведено рестрикційний аналіз рекомбінантної плазмиди pBA 2, яка забезпечує стійкість клітинам *Escherichia coli* до біалафосу при експресії bar гена під контролем 35S промотора. На основі проведеного аналізу побудована рестрикційна карта плазмиди pBA 2 (мал.6).



Мал.6. Рестрикційна карта рекомбінантної плазмиди pBA 2, яка містить ген стійкості до біалафосу, фланкований еукаріотичними регуляторними послідовностями.

Таким чином, ми одержали рекомбінантну плазмиду рВА 2, яка містить ген стійкості до гербіциду біалафосу з АТГ кодоном ініціації трансляції, фланкований еукаріотичними регуляторними послідовностями.

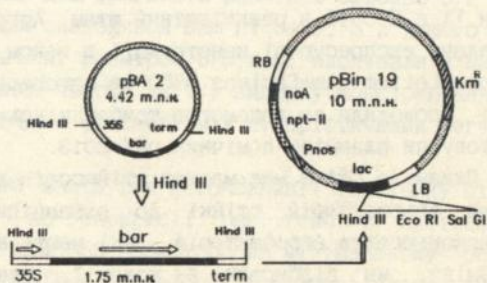
Тепер необхідно було створити конструкцію, яка б забезпечила передачу та інтеграцію клонованого нами гена в геном вищих рослин.

### 5. Передача bar гена в бінарний вектор для трансформації рослин.

Для трансформації рослин ми вибрали метод, розроблений на основі системи переносу ДНК штамми *Agrobacterium tumefaciens*. Серед векторів, які звичайно використовуються, ми вибрали вектор транс-типу, а саме - бінарний вектор рВін 19. Вектор рВін 19 сконструйований на основі плазмиди, яка має послідовності границь Т-ДНК, що забезпечують інтеграцію необхідної конструкції в геном вищих рослин. В полілінкері вектора рВін 19 є сайт узнавання рестриктази *Hind* III. За допомогою цієї ж рестриктази ми можемо вирізати фрагмент з плазмиди рВА 2, який має 35S промотор, *bar* ген і Poly A частину гена нопалінсинтетази (мал.7). Клонуючи *Hind* III фрагмент з плазмиди рВА 2 в відповідний сайт бінарного вектора, ми одержали рекомбінантну плазмиду рВА 3 (мал.8).

Клонування проводили в штамі *E.coli* JM 101. Відбір рекомбінантних клонів здійснювали по забарвленню на середовищі з Xgal і IPTG. Потім рекомбінантні клони переносили за допомогою репліка-

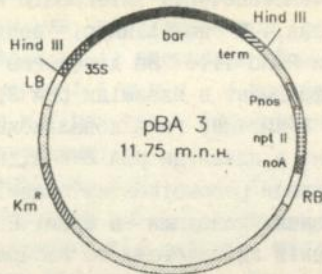
Мал.7. Схема передачі гена стійкості до біалафосу, фланкованого еукаріотичними регуляторними послідовностями, в бінарний вектор для трансформації рослин.



тора на мінімальне середовище з канаміцином та гербіцидом в концентрації від 1 до 20 мкг/мл для перевірки експресії *bar* гена під контролем 35S промотора в векторі для трансформації рослин. Клони, що мають рекомбінантну плазмиду рВА 3, стійкі до біалафосу в концентрації 10 мкг/мл. Тобто рівень стійкості такий же, як і при експресії *bar* гена під контролем 35S промотора в векторній плазмиді рСАМV. Рекомбінантні плаزمиди, виділені з одержаних клонів мали додатковий *Hind* III фрагмент розміром 1.75 т.п.н. (*bar* ген, фланкований еукаріотичними регуляторними послідовностями).

Таким чином, ми одержали експресуючу конструкцію, яка містить *bar* ген під контролем еукаріотичних регуляторних сигналів та ген стійкості до канаміцину для прямої селекції в рослинах, фланковані границями Т-ДНК (LB та RB), які забезпечують інтеграцію цієї конструкції в геном вищих рослин.

Мал.8. Карта експресуючої конструкції для трансформації рослин з геном стійкості до гербіциду біалафосу.



Для проведення трансформації рослин одержаною конструкцією за допомогою агробактеріальної системи трансформації необхідно передати її з *E. coli* в реципієнтний штам *Agrobacterium tumefaciens*. Передачу експресуючої конструкції з геном *bar* в реципієнтні штам *Agrobacterium tumefaciens* 3850 та *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 проводили за допомогою трибатьківського схрещування, використовуючи плазмиду-помічник рРК 2013.

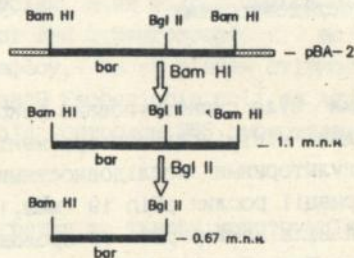
Плазмиду рВА 3 має маркер стійкості до канаміцину (*Km*), а штам агробактерій стійкі до рифампіцину (*Rf*). Таким чином, транскон'юганти агробактерій, які мають необхідні рекомбінантні плаزمиди, ми відбирали як колонії, резистентні до *Km* і до *Rf*. Одержані рекомбінантні клони агробактерій були стійкі на міні-

мальному середовищі до гербіциду біалафосу в концентрації 10 мкг/мл. Штами *Agrobacterium tumefaciens* 3850 та *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 стійкі до біалафосу в концентрації, яка не перевищує 1 мкг/мл.

### 6. Одержання мініпохідної плазмиди рВА 2.

З метою визначення мінімального фрагмента ДНК, який би забезпечував стійкість до біалафосу, нами була одержана мініпохідна плазмиди рВА 2.

Структурна частина гена *bar* закінчується в області сайту унавання рестриктази *Bgl* II ( тут знаходиться стоп-кодон TGA ). Виходячи з цього, а також з даних рестрикційного аналізу, ми гідролізували плазмиду рВА 2 рестриктазою *Bam* HI, провели електрофорез, елюювали з геля фрагмент розміром 1.1 т.п.н. (мал.9).



Мал.9. Схема одержання міні-похідного фрагмента ДНК з геном стійкості до біалафосу.

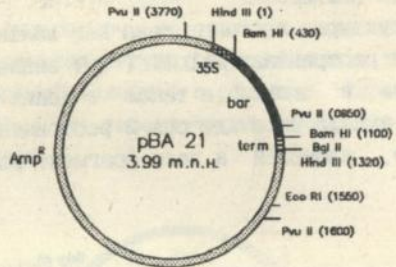
Після очистки, провели гідроліз цього фрагмента рестриктазою *Bgl* II. В результаті ми одержали два фрагменти розміром близько 670 і 430 п.н., з одного боку яких знаходився *Bam* HI сайт, а з іншого - *Bgl* II сайт. Одержаний фрагмент розміром 670 п.н. клонували в *Bam* HI сайт плазмиди рСАМV. Таким чином, як і у випадку конструювання плазмиди рВА 2, ми розміщували фрагмент між еукаріотичними регуляторними послідовностями.

Рекомбінантні клони, які мають ген детоксикації гербіциду біалафосу, ми відбирали по експресії *bar* гена в клітинах *Escherichia coli* під контролем 35S промотора на мінімальному середовищі з різними концентраціями біалафосу. Відібрані клони, були стійкі до біалафосу в концентрації 20 мкг/мл. Таким чином по-

казано, що мінімальний фрагмент, який визначає стійкість до гербіциду біалафосу має розмір близько 670 п.н..

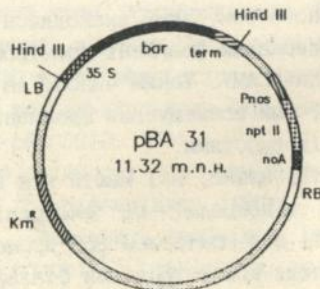
З метою визначення орієнтації *bar* гена по відношенню до 35S промотора в векторі pSAMV проведено рестрикційне картування одержаної рекомбінантної плазмиди pBA 21 за допомогою ряду рестриктаз. На основі проведеного аналізу побудована рестрикційна карта плазмиди (мал.10).

Мал.10. Рестрикційна карта рекомбінантної плазмиди pBA 21, яка містить мінімізований фрагмент в гені стійкості до біалафосу, фланкований еукаріотичними регуляторними послідовностями.



Далі нами була сконструйована рекомбінантна плазміда pBA 31, шляхом передачі мінімізованого фрагмента з *bar* геном і еукаріотичними регуляторними послідовностями в склад бінарного вектора для трансформації рослин pBin 19 (мал.11). Передачу конструкції з плазмиди pBA 21 в вектор pBin 19 проводили як і у випадку з плазмідною pBA 2. Штам *E. coli* JM 101 з плазмідною pBA 31, стійкий до біалафосу в концентрації 20 мкг/мл.

Мал.11. Карта експресуючої конструкції для трансформації рослин з мінімізованим фрагментом, що містить ген стійкості до гербіциду біалафосу.



Таким чином, плазмиди рВА 21 та рВА 31 надають клітинам *E.coli*, експресуючись під 35S промотором, стійкість до гербіциду біалафосу в концентрації 20 мкг/мл, що вдвічі вище ніж у випадку з плазмідами рВА 2 та рВА 3, де розмір фрагмента з *bar* геном становить 1.1 т.п.н..

Передачу плазмиди рВА 31 із *E.coli* в *Agrobacterium tumefaciens* проводили, як і в попередньому випадку, за допомогою трибатьківського схрещування. Як реципієнтний штам використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* 3850. Одержані трансконьюганти агробактерій стійкі до біалафосу в концентрації 20 мкг/мл.

Результати блот-гібридизації підтвердили наявність *bar* гена в усіх одержаних генно-інженерних конструкціях, як в *Escherichia coli*, так і в *Agrobacterium tumefaciens*.

Отже, ми одержали дві експресуючі конструкції рВА 3 та рВА 31 з геном *bar*, які мають регуляторні послідовності для експресії в рослинах та ліву і праву границі Т-ДНК, необхідні для інтеграції конструкцій в геном вищих рослин. Вони відрізняються між собою за розміром фрагмента геномної ДНК *S.hygrosopicus*, що забезпечує стійкість до гербіциду біалафосу, та за рівнем стійкості до біалафосу, який надають клітинам *Escherichia coli* та *Agrobacterium tumefaciens*, експресуючись під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти.

#### 7. Трансформація рослин гречки та тютюну конструкціями з *bar* геном.

За допомогою агробактеріальної системи трансформації проведено трансформація рослин тютюну і гречки конструкцією рВА 3. Проведено молекулярно-біологічний аналіз рослин, які регенерували на середовищі з канаміцином. За допомогою метода дот-гібридизації показано, що з 6-ти проаналізованих рослин 1 рослина тютюну та з 8-ми проаналізованих рослин 5 рослин гречки (мал.12) дали позитивну авторадіографічну відповідь при гібридизації з геном *bar*.

5 ідентифікованих рослин гречки були проаналізовані за допомогою метода блот-гібридизації. Як видно з мал.13, фрагменти ДНК рослин, що дали позитивну авторадіографічну відповідь, мають такий же розмір, як і фрагмент з геном *bar*, фланкований еукаріотичними регуляторними послідовностями, який використовувався для трансформації рослин.

Мал.12. Аналіз ДНК рослин гречки за допомогою метода дот-гібридації.

А - ДНК рослин, які дали позитивну авторадіографічну відповідь.

В - позитивний контроль ( Hind III - фрагмент плазмиди рВА 3 з геном bar ).

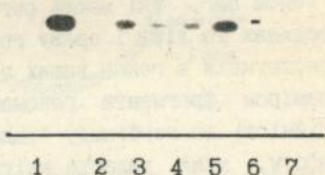
С - негативний контроль (ДНК нетрансгенної рослини гречки).

Мал.13. Аналіз ДНК рослин гречки за допомогою метода блот-гібридації.

1 - позитивний контроль ( Hind III - фрагмент плазмиди рВА 3 з геном bar ).

2- 6 -ДНК рослин, гідролізованих рестриктазою Hind III, які дали позитивну авторадіографічну відповідь.

7 - негативний контроль (ДНК нетрансгенної рослини гречки).



Це свідчить про те, що створені нами конструкції забезпечують передачу та інтеграцію bar гена в геном вищих рослин.

В теперішній час проводиться вивчення стійкості одержаних трансгенних рослин до гербіцидів білафосу та фосфінотрицину.

### ВИСНОВКИ

1.Шляхом клонування в клітинах *Escherichia coli* Pst I фрагментів ДНК створений банк генів геномної ДНК *Streptomyces hygrosopicus*.

2.В одержаному банку ідентифікована рекомбінантна плазміда рВА 1, яка містить ген, що визначає стійкість до гербіциду білафосу.

3.Проведено рестрикційний аналіз рекомбінантної плазмиди рВА1 і побудована її фізична карта.

4. Проведена модифікація гена *bar* шляхом заміни кодону ініціації трансляції GTG на ATG кодон.

5. На основі вектора pBin 19 створені конструкції pBA 3 та pBA 31 для експресії гена *bar* в клітинах рослин.

6. Використовуючи експресуючі конструкції з геном *bar*, одержані трансгенні рослини гречки та тютюну.

7. За допомогою молекулярно-біологічного аналізу підтверджено наявність *bar* гена в геномі трансгенних рослин.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації.

1. Заяц А.И. Конструирование клонотеки *Streptomyces hygrosopicus* с целью клонирования генов устойчивости к гербициду биалафосу // Актуальные проблемы физиологии растений и генетики. Тезисы докладов конференции молодых ученых (26-28 мая 1992 г.) . - Киев.-1992.- С.88.

2. Levenko B.A., Stekhin I.N., Mar'yushkin V.F., Melnik A.I., Sayaz A.I., Bogomolova N.M. Working out the methods of obtaining herbicide resistance plants and analysis of transgenic plants // Advanced school on: "Gene transfer and regulation of their expression in eukaryots". - Kiev.- 1993.

3. Заяц А.И., Стехин И.Н., Путилина Н.В., Левенко В.А. Клонирование гена устойчивости к гербициду биалафосу // Биополимеры и клетка.-1994.-Т.10, №3-4.-С.82-86.

4. Заяц А.И., Стехин И.Н., Путилина Н.В., Левенко В.А. Создание экспрессирующихся конструкций с геном *bar* для трансформации растений // Биополимеры и клетка.-1994.-Т.10, №3-4.-С.87-90.

AB 31.227  
**AB 31.227**