

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Р. А. ЗАХАРЯН

Обобщены последние достижения по генной инженерии, клонированию и экспрессии в бактериальной клетке генов ряда полипептидных гормонов: проинсулина, инсулина, гормона роста, соматомаммотропина, а также овальбумина; приведены основные методические подходы по конструированию рекомбинантных ДНК, включая данные по экстрахромосомальным генам у бактерий и плазмидам биодеградации.

Ключевые слова: рекомбинантная ДНК, плазида, клонирование и экспрессия гена.

Клонирование и экспрессия генов в бактериальной клетке. Развитие исследований по химическому, биохимическому синтезу гена и первичной структуре ДНК, в частности клонируемых генов и ДНК векторных молекул, предопределили успех работ по клонированию и экспрессии ряда структурных генов эукариотов, что, по общему признанию, позволяет рассчитывать на быстрый прогресс в данной области.

Группа ученых отдела молекулярной биологии «Генетикс» [24] осуществили отдельный биосинтез двух полипептидных цепей (А и В) человеческого инсулина в бактериальной клетке *E. coli* в составе рекомбинантной молекулы плазмиды PBR 322, в которой гены А и В были встроены в карбоксильный конец гена бета-галактозидазы. Ступенчатым методом был осуществлен химический синтез правой и левой половин гена В (ВВ и ВН соответственно), ген А был собран из трех частей. Гены ВВ и ВН были клонированы в составе плазмиды PBR 322, получены векторы PVB 101 и PVB-1, в которых правая и левая половины гена В встроены по сайтам *E. coli* I и *Hind*-III. Ген А встроен в PBR 322 по сайтам *E. coli* I и *Bam*HI. Правая и левая фрагменты гена В были сцеплены с геном галактозидазы, рестрицированной *E. coli* I из λ -plac-5, в составе плазмиды pIB1. Ген А аналогичным путем был встроен в составе плазмиды pIA1. В экспрессии изучены штаммы D12.101/pIB1 и 294/pIA1 соответственно для генов В и А, эти штаммы продуцировали сцепленный гибрид бета-галактозидаза-А или В-полипептидную цепь, 20% от клеточного белка. Относительный выход по отдельным цепям инсулина тоже высокий—10 мг от 24 г бактериальной массы. Однако степень правильной коррекции двух полипептидных цепей относительно друг друга в воссоздаваемой нативной структуре инсулина, тестируемой радиоиммунологически, невысок—около 10%.

Идею использовать секретлируемую в периплазму *E. coli* пеницилли-

пазу или ее гидрофобный фрагмент в качестве транспортера сцепленно-го с ним проинсулина крысы удалось успешно осуществить в Гарвард-ском университете [37].

Структурный ген к-ДНК проинсулина [37] был встроен внутрь пенициллиназного гена плазмиды PBR 322 в сайте рестрикции эндонуклеазой $P_{st}I$: была сконструирована рекомбинантная плазмида P-147 следующей структуры: ген пенициллиназы (24—182)—(gly)₆—проинсулин (4—86), P-147 в *E. coli* X1776-p147 экспрессировала ген проинсулина в составе гибридного протеина с пенициллиназой. Авторы получили доказательство транспорта гибридного полипептида в периплазму. Синтез проинсулина выявлен радиоиммунологически: определен синтез около 100 молекул на бактериальную клетку, что соответствует нескольким pg. Работы данной группы продолжены в двух направлениях: экспрессией генов человеческого инсулина и создания рекомбинантной плазмиды на основе PBR 322, в которой ген инсулина связан непосредственно с гидрофобным полипептидом пенициллиназы. Аналогичный подход был использован в лаборатории Гуддмана при конструировании рекомбинанты ДНК гормона роста [32].

Гибридный ген был сконструирован между бета-лактамазным геном плазмиды PBR 322 и к-ДНК крысиного гормона роста, клонированной в составе рМВ9. Предполагалось, что ген ампициллина в рекомбинанте будет обеспечивать синтез гибридного с гормоном роста бета-лактамазы, которая будет транспортировать синтезированный гибрид в периплазму. Оба гена имеют один сайт рестрикции $P_{st}I$, удачно обеспечивающий синтез гибрида; в гене ампициллина $P_{st}I$ сайт рестрикции расположен приблизительно в 2/3 от конца; в клонированном гене гормона роста—в нескольких основаниях от инициационного кодона пре-пептида. Гибридная плазмида рEx-RgH включала последовательности оснований, кодирующие N-терминальный конец ампициллина со 181 аминокислотным остатком, ковалентно сцепленным с последовательностью оснований для 214 аминокислотных остатков пре-гормона роста. Синтез гормона роста был обнаружен радиоиммунологически. Гибридный протеин не был обнаружен в периплазме, предполагается, что гидрофобный фрагмент бета-лактамазы в центре гибридного протеина с гормоном роста не активен в обеспечении процесса секреции. Количество синтезированного гормона было измерено весьма приблизительно—около 24000 молекул на клетку. Предполагается деградация синтезированного гибридного белка.

Та же группа авторов разработала подходы для экспрессии генов ряда других полипептидных гормонов млекопитающих (соматостатина, соматомаммотропина); получен 92%-ной чистоты фракция ДНК-ген, кодирующий человеческий соматомаммотропин [33]; ген этот, к-ДНК, синтезирован на мессенджер поли-А-РНК, выделенной из человеческой плаценты и очищенной до 50% хроматографией на dT-целлюлозе и последующим фракционированием в градиенте сахарозы. к-ДНК гормона далее очищен последовательной рестрикцией эндонуклеазами Hae-III

и Hha-I и изолирован электрофоретически. Полученный ген κ -ДНК в 550 оснований изучен на последовательность, клонирован в pMB9 (PHCS-1), изолирован из плазмиды и вновь изучена последовательность в гене. Соответствие полученного гена известной структуре соматомаммотропина позволяет полагать возможное успешное клонирование и экспрессию κ -ДНК гормона в составе плазмиды с «активным» промотором.

Значительного успеха в клонировании и экспрессии эукариотического гена (овальбумина) добилась исследовательская группа фирмы «Апджон»; она получила экспрессию данного белка в составе рекомбинанты рис-1001 в $E. coli$ [36]. Рекомбинантная ДНК рис-1001 была сконструирована на основе плазмиды pOV 203 , которая содержит Nae-III фрагмент Lac -оперона в 203 пар оснований в составе: промотор, сайт, связывающийся с рибосомой («Шайн-Далгарно»-участок, кодон инициации), и кодон для первых семи аминокислот бета-галактозидазы; pOV 203 имеет сайт рестрикции $E. coli$ coRI , локализованный за инициационным кодоном бета-галактозидазы.

Фрагмент гена овальбумина был получен рестрикцией плазмиды pOV-203 эндонуклеазой Tag-1 ; один сайт рестрикции расположен в 25 парах оснований от $5'$ конца инициационного кодона AUG гена овальбумина, другой локализован в 250 парах оснований вне района гена овальбумина в составе вектора; таким образом, рестрикцией Tag-1 был выщеплен из pOV-230 фрагмент в 2200 пар оснований, несущий целостный ген овальбумина, который был встроен в состав плазмиды в сайте рестрикции $E. coli$ coRI , сохранив тем самым в составе гибрида инициационный кодон бета-галактозидазы, как стартовый сайт биосинтеза овальбумина. Овальбумин—самый большой по молекулярному весу протенин 43000 d, на сегодня успешно синтезированный в бактериальной клетке; $E. coli$ продуцировал 1.5% овальбумина от клеточного белка. Предполагается увеличить выход овальбумина до 10% за счет транспозиций в составе Lac -промотора. Синтезированный овальбумин секретировался в периплазму—существенное обстоятельство, свидетельствующее о том, что механизмы узнавания, обеспечивающие транспорт протенина в эукариотической системе, имеют много общего с процессом транспорта в периплазму у прокариотов. Эта находка, несомненно, найдет реальнейшую разработку в генноинженерных исследованиях по созданию промышленных штаммов.

Значительный интерес представляют исследования в Гарвардском университете, руководимые Пташице [31], по повышению экспрессии гена в составе рекомбинантной ДНК на основе идеи так называемого «переносного активного промотора». Уровень синтеза любого белка зависит: а) от частоты транскрипции соответствующего гена, б) эффективности трансляции соответствующей и-РНК; «а» предопределен термином «активный» промотор, «б»—наличием в мессенджер РНК соответствующего сайта прикрепления в составе трансляционного стартового кодона AUG (ГУГ) и последовательности Шайн-Далгарно (SD),

комплементарной к 3' концу 16S рибосомальной РНК, изученной для большинства и-РНК *E. coli* в 3—9 оснований в 3—12 положениях от старта трансляции. Эти представления использованы в эксперименте для повышения биосинтеза протенна, в данном случае *cl* (репрессора), путем конструирования рекомбинантной ДНК, в которую встроены одна или более копий «активного» промотора *Lac*. в различных дистанциях от гена *cl* репрессора в составе плазмиды рМВ9; при этом был создан гибридный, с рибосомой связывающийся сайт: *Lac*. промотор-сегмент включал Шайн-Далгарно последовательность $\frac{AGGA}{TTCCT} + 5$ добавочных оснований, остальные сегменты *Z*-гена, включая его инициаторный АТГ, были удалены рестрикционной эндонуклеазой; фрагмент

С1

ДНК*cl*-гена включал сегмент $5' \frac{CGTATG}{3'CATAC} +$ дальнейшую последовательность *cl*. Анализ рекомбинантной структуры РКВ-280 показал, что *Lac*. промотор связан с *cl*-геном через 8 оснований между *Lac*-*Z*, *SD* и АТГ*cl* [15].

Экспрессия *cl*-гена происходит в составе активного промотора в 250 раз активнее, нежели в составе своей системы, где *SD cl*-гена отделен от *cl*-АТГ 11-ю основаниями. Высокий уровень продукции репрессора достигнут вариацией дистанции между 2 элементами гибридного участка, ответственного за связывание с рибосомой.

Марк Пташье и сотр. [31] разработали универсальный подход по повышению экспрессии практически любого структурного гена в составе рекомбинантной плазмиды PBR 322, позволяющий встраивать *Lac*. промотор-фрагмент в нужном положении к структурному гену (в частности, к гену «сго» фага). Один из рекомбинантов синтезировал 190000 мономеров протенна сго на клетку.

Для выяснения структурных особенностей промоторов, контролирующих экспрессию гена, проведено изучение последовательности оснований в слабом промоторе и в мутантном «активном». Дикий тип *i* гена (*Lac* репрессор) слаб, конститутивен, транскрипция этого гена происходит один или дважды за генерацию, продуцирующей 10 молекул репрессора на клетку. В сравнении с другими промоторами последовательность в позиции (—10) такая же, что и в *Pribnow box* с типичной вариацией. Спейсер между *Pribnow box* и стартом и-РНК здесь необычен, более богат ГЦ, нежели АТ, и может обуславливать слабое связывание РНК-полимеразы. Последовательность ТГ ТТГ в области (—35) также отклонена в ТГГЦГ, существенно отклонение в «С» в четвертой позиции: его мутация в «Т» критически изменяет средство РНК-полимеразы и повышает 10-кратно экспрессию гена. Изучение подобных вариаций позволит понять и выработать определенные рамки структурных модификаций на нуклеотидном уровне в направленной регуляции активности гена.

Кроме теоретической ценности, эти и подобные исследования най-

дуют приложение в генноинженерных исследованиях по созданию высокопродуктивных промышленных штаммов микроорганизмов.

Гибридные векторы плазмиды-плазмиды серии PCV и плазмиды-фаг получены в лаборатории Баева [8, 9, 11, 12]. В составе этих векторов возможно клонирование фрагментов-генов, рестрицированных эндонуклеазами, генерирующими липкие концы: E. coRI, Hind-III, Sal-I, Bam-I, Pst-I, и Sma-I, а также рестрицированные комбинированным действием двух ферментов; такой подход обеспечивает единственно возможное, правильное соответственно направлению процесса трансляции ориентированное включение клонируемого гена [12]. Эти векторы имеют еще одно преимущество: относительно широкий набор сайтов рестрикции по ряду эндонуклеаз.

Рекомбинантные ДНК на основе генов энтомопатогенных бацилл. В программе генноинженерных работ ведутся работы по рекомбинантным ДНК для энтомопатогенных бацилл.

Целью этих исследований является повышение патогенности энтомопатогенных штаммов *Bac. thuringiensis* и *Bac. popillae* и расширение спектра их действия и эффективности их против вредителей сельского хозяйства.

В настоящее время изучаются возможные векторы для этих бактерий; программа намеченных исследований включает изучение их трансформации плазмидой *Staphyl. aureus*-pub-110 $\text{kan}^r/\text{heo}^r$, с учетом успешных исследований Ловетт и др. по репликации и экспрессии плазмиды pub-110 в *Bac. subtilis*, а также рекомбинантных ДНК, на основе этой плазмиды, несущей ген триптофана.

Трансформация *Bac. thuringiensis* будет проведена по Спизайзен для *Bac. subtilis* в модификации Рив для *Bac. thuringiensis* в разные фазы размножения бацилл при вариации источников углерода, азота, аминокислотного состава среды, типа катионов или хелатных соединений. Одновременно изучаются известные векторы системы *E. coli*; PSC-101, PMB-9, PBR-322, в составе которых тимидилат-синтетазный ген был экспрессирован в *Bac. subtilis*.

Программа намеченных исследований включает конструирование гибридных плазмид из хромосомной ДНК *Bac. thuringiensis* и собственной плазмидной ДНК или ДНК подходящего вектора, структурную характеристику полученных рекомбинантов, трансформацию ими по соответствующим маркерам, а также изучение экстрахромосомальных генетических элементов, плазмидных генов у разных штаммов *Bac. thuringiensis* и возможность их использования в качестве векторов. В настоящее время изучены плазмидные гены у 4 разновидностей *Bac. thuringiensis* [2, 5—7, 23], а также у *Bac. popillae* [23]. Определенный интерес представляет наличие в токсинобразующих штаммах *Bac. thuringiensis* плазмидной ДНК с относительно высоким молекулярным весом: $90 \cdot 10^6$ d $50 \cdot 10^6$; $45 \cdot 10^6$ d (табл. 1).

Рекомбинантные ДНК на основе плазмид биодegradации. Существенный теоретический интерес, позволяющий понять особенности моле-

Число и молекулярные веса плазмидных генов у культур *Bac. thuringiensis* (BT)
и *Bac. popilliae* (B. P.)

| Штамм | BT var. caucasicus | BT var. kurstaki | BT var. galleriae | BP |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|------|
| | 90 | 50 | | |
| | 10 | 45 | 10 | |
| | 12 | 29,9 | 12 | |
| Молекулярный вес $\times 10^6$ Д | 5 | 17,1 | 6 | |
| | | 7,4 | | |
| | | 4,2 | | 4,45 |
| | | 3,9 | | |
| | | 1,1 | | 0,58 |
| | | 0,8 | | |

кулярной организации генетических единиц в составе структуры плазмид, и практический интерес в плане конструирования штаммов микроорганизмов, несущих мультиплазмидные рекомбинантные ДНК, кодирующие усвоение циклических углеводов (отходы нефтехимической промышленности), представляют плазмиды биодegradации, обнаруженные у бактерии рода *Pseudomonas*, в частности, почвенных псевдомонад.

В штаммах почвенных псевдомонад описаны экстрахромосомальные гены — плазмиды биодegradации: нафталина, салицилата, октанола, камфоры, ксилена [17, 18, 20, 21, 26], недавно описаны плазмиды, разлагающие лигнин, гербициды, соединения типа ДДТ, никотин [11, 16, 35].

Установлено, что для плазмид биодegradации, в отличие от плазмид цитоплазматической локализации, характерна преимущественно околохромосомальная локализация, возможно, через РНК-овый коннектор [1, 3, 28]. Некоторые из них изолированы в форме суперспирализованных молекул циркулярных ДНК и охарактеризованы физико-химически, хотя у разных авторов по причинам, недостаточно ясным, получены разные показатели по некоторым физико-химическим параметрам ДНК для нафталина, салицилата и толуола. Плазмиды биодegradации NAN и SAL кодируют катаболизм нафталина и салицилата через мета-путь разложения катехола, и салицилат является промежуточным соединением дegradации нафталина, что предполагает сходную структуру генетической организации ДНК этих плазмид. Имеющиеся в литературе немногочисленные данные двух групп исследователей о плазмидах NAN и SAL отличаются друг от друга, и до настоящего времени не получено удовлетворительного объяснения обнаруженной вариабельности ряда физико-химических свойств [22, 25, 26, 28].

Нами выделены, физико-химически и электронномикроскопически охарактеризованы экстрахромосомальные, циркулярные, молекулы плазмидных ДНК, способные усваивать нафталин, салицилат; установлена их предпочтительная околохромосомальная локализация, также изучен ряд криптоических плазмидных ДНК этих штаммов [1, 3, 4].

Исходя из представлений, полученных на основе генетических исследований о кластерном характере расположения генов биодegradации

тии в хромосоме, в настоящее время интенсивно изучается структура ДНК генов биодegradации. Проведены (*in vivo*) исследования в направлении получения от целой плазмиды сегрегатов, собственно генов биодegradации в виде нетрансмиссибельных репликонов и генов-фактора трансмиссибельности и транспозиции генов по биодegradации и плазмид, разлагающих салицилат и толуол в составе R-плазмид [19]. В экспериментах *in vivo* получены рекомбинантные ДНК на основе плазмиды биодegradации TOL 75-10⁶ d и гена бета-лактамазы (Tn-401) около 3-3×10⁶ d. Данный рекомбинант был получен путем совмещения плазмиды TOL в бактериальном штамме, содержащем рекомбинантную R-детерминанту, в которую ген Tn-401 был перенесен из плазмиды RPI.

Гибридная ДНК TOL:Tn-401 стабильно экспрессировала фермент бета-лактамазу в штаммах *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, равно как и репликативные и конъюгативные функции; однако способность к утилизации толуатов проявлялась только в шт. *Ps. putida*; последнее, по-видимому, связано с наличием определенной взаимозависимости процессов индукции и экспрессии хромосомальных и экстрахромосомальных генов биодegradации у шт. *Ps. putida*.

Показано, что конъюгативная плазида, кодирующая разложение никотина и никотината в процессе конъюгативного переноса из *Ps. corymbosa* в *Ps. putida*, в трансконъюгатах распадается на два независимых репликона: секс-фактор T и собственно неконъюгативный репликон структурных генов биодegradации никотина (личное сообщение Такер Р.). Слияние плазмиды TOL с R-детерминантом R-91 с образованием рекомбинантной плазмиды RND-3, кодирующей резистентность к карбенциллину и способность роста на толуене, ксилене, M-толуате, предполагается на основе структур is--подобных последовательностей.

В связи с изложенным определенным интерес представляет изучение структурной гомологии между конъюгативными факторами фертильности в составе плазмид биодegradации и известными «самостоятельными» факторами типа «K», «FP» и др. у *Ps. putida*.

Каковы структурные особенности специфических участков плазмидных ДНК, обеспечивающие процессы рекомбинации отдельных репликонов в коинтеграты и процессы сегрегации? Одни из них—вставочные сегменты is интенсивно изучаются. Некоторые из них экспериментально перенесены в состав генов биодegradации SA1, TOL [19]; предполагается их присутствие в природном SA1, NAH.

Определенный интерес представляет идентификация кластеров генов биодegradации в составе фрагментов-рестриктов с целью конструирования рекомбинантной ДНК на основе плазмид биодegradации в условиях *in vitro*.

Сравнительный анализ электрофоретического распределения в агарозном геле фрагментов ДНК плазмид NAH и SA1, рестрицированных эндонуклеазой *E. coli* I, выявил приблизительно одинаковое число фрагментов, до 23, как для NAH, так и для SA1 и в достаточной степени сходный профиль их миграции в агарозном геле (Р. Захарян и др. в пе-

части). Оценка молекулярных весов полученных фрагментов проведена согласно маркерам-фрагментам ДНК плазмиды RPI, рестрицированной эндонуклеазой Sma. По данным ряда авторов, эндонуклеаза E. coRI фрагментирует ДНК плазмиды NAN (штаммы 2125) и SAL (штамм 2115) на 10 одинаковых по молекулярному весу фрагментов [22]; другие исследователи указывают на образование 19—20 идентичных фрагментов для NAN (Ppg7) и SAL (AC 165). Согласно нашим данным, число фрагментов при рестрикции с E. coRI достигает 23-х в случае с NAN и SAL. Можно предположить определенную неоднородность в структуре ДНК в популяции плазмид NAN и SAL, чем, возможно, и объясняется некоторая разноречивость данных, имеющих в литературе (табл. 2).

Таблица 2

Число и молекулярные веса плазмидных генов у *Pseudomonas putida*

| Штамм | Плазида | Молекулярный вес $\times 10^6$ Д | EcoRI число фрагментов |
|--------------------|--------------|----------------------------------|--------------------------|
| Ppg 7 | NAN | ~43 | 10 [22] 20 [25] 23 |
| Ppg 2115 AC 165 | SAL | ~43 | 10 [22] 19 [25] 23 |
| AC 36 | | 36, 97, 62, 52 | [28] |
| Ppg 7 | криптические | 3—18 | [4] |

Клонирование и экспрессия генов в эукариотической клетке. В настоящее время создание ген-транспортующей системы для клеток млекопитающих основывается на исследованиях по конструированию рекомбинантной ДНК на основе ДНК вируса SV-40 [30], вируса полиомы, включая изучение псевдовирсиона полиомы, как возможной ген-транспортующей системы, несущей определенный фрагмент ДНК-ген в составе вириона или искусственной вирусоподобной частицы [13, 14].

Возможность активной экспрессии гена, фрагмента эукариотической ДНК в составе вирусного вектора в эукариотической клетке была продемонстрирована в исследовании с геном глобина к-ДНК крысиного бета-глобина была вставлена в состав ДНК SV-40 на место гена, кодирующего белок капсиды VP-1 [30]. Рекомбинантная ДНК SVGM5-RaBg эффективно размножалась в клетках CV-1, продуцируя и-РНК бета-глобина; клетки CV-1, зараженные рекомбинантом, синтезировали значительное количество этого полипептида.

В полученном рекомбинанте практически вся область гена VP-1 замещена на к-ДНК бета-глобина: инициационный кодон гена бета-глобина, его с рибосомой связывающий участок заменили соответствующие сегменты VP-1, трансляционный терминатор бета-глобина занял положение проксимальное VP-1 терминатора, оставшегося в векторе. Таким образом, в данном векторе были сохранены все области, вовлеченные в про-

цесс инициации транскрипции, терминации, сплайзинга, полнаденилирования 16 и 19-S и-РНК SV-40. Данная стратегия обеспечила транскрипцию в составе рекомбинанты, функционально активной соответствующей и-РНК. Получены $2,5 \times 10^4$ бляшек на лигированной ДНК; из изученных 50 40 содержали бета-глобин. Однако синтезируемый бета-глобин разрушался быстро—в течение 60 мин. В данной лаборатории осуществлена экспрессия в составе SV-40 тимидинкиназного гена, гена гуанин-фосфорибозилтрансферазы, генов H2A и H4 гистонов *Dr. melanogaster*. Запланированы исследования по изучению возможности экспрессии геномного гена бета-глобина: транскрипции, процессинга и трансляции соответствующей и-РНК, перемещении позиции бета-глобинового гена в различные позиции поздних и ранних генов SV-40.

Ген бета-глобина крысы был клонирован в составе ДНК SV-40 также в лаборатории Ледера. Различные участки «поздних» выделенных генов в составе ДНК SV-40 были замещены на ген бета-глобина, полученного из клонированной к-ДНК. Рекомбинант, который сохранял промотор-лидирующий сегмент, интроны для поздней и-РНК, обеспечивал транскрипцию стабильного гибрида SV-40—глобинового транскрипта, который, как показали радиоиммунологические тесты, эффективно транслировался в культуре клеток. Рекомбинант же, имеющий ту же структуру, но лишенный области «сплайзинга», не обеспечивал синтеза стабильного транскрипта и-РНК, равно как и трансляции. Полученный результат свидетельствует о том, что определенный фрагмент приблизительно в 500 пар оснований, обеспечивающий «сплайзинг», необходим для накопления и трансляции стабильных фракций и-РНК в эукариотической системе. Определенные успехи достигнуты в конструировании ген-транспортной системы на основе искусственной вирусоподобной частицы [13, 14].

На основе высокоочищенных препаратов белковой капсиды вируса полиомы и фрагментов гомологичной и гетерологичной ДНК (полиома вируса SV-40, фага λ , ДНК тимуса) в условиях низкой ионной силы (*in vitro*) сконструирован новый тип искусственной вирусоподобной частицы, в составе которой ДНК резистентна к действию панкреатической ДНКазы, и полученный комплекс стабилен в условиях высокой ионной силы. Искусственная вирусоподобная частица (ИВЧ) содержит внутри капсиды гомогенную ДНК с молекулярным весом 1,150—1,2·10⁶ дальтон. Плотностный анализ демонстрирует промежуточную плотность ИВЧ между вирусом и белковой капсидой.

Электронная микрография свидетельствует о том, что в ИВЧ ДНК защищена внутри вирусной капсиды. Получен результат, согласно которому гистоны способствуют формированию и сборке ИВЧ.

Эндонуклеазный анализ ферментами-рестриктазами свидетельствует о том, что в ИВЧ включается статистически вероятный набор фрагментов как гомологичной, так и гетерологичной ДНК. ИВЧ будет использована для транспорта в ядра клеток гомогенного набора определенных структурных генов.

Получены предварительные данные по экспрессии гена Т-антигена вируса SV-40, транспортированного в составе ИВЧ, в культуре клеток 3Т3. Синтез Т-антигена SV-40 в инфицированных ИВЧ клетках 3Т3 в ядре и цитоплазме был обнаружен через 24 ч после инфекции методом иммунофлюоресцентного анализа после соответствующей обработки инфицированных клеток флюоресцином, конъюгированным с анти-SV-40 Т-антигеном.

Теоретическая и практическая важность исследований по генной инженерии обуславливает широкую и обширную программу работ, развертываемых в нашей и ряде других стран.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 14 VII 1980 г.

ՌԵԿՈՄԲԻՆԱՆՏԱՍՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ՄՈԼԵԿՈՒԼՅԱՐ ԿԼՈՆԱՎՈՐՈՒՄԸ ԵՎ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՆ

Ռ. Ա. ՉԱԿԻԱՐՅԱՆ

Մշակված են մեթոդական մոտեցումներ ֆունկցիոնալապես ակտիվ ռեկոմբինանտային ստրուկտուրաների կառուցման ռեկոմբինանտային ԴՆԹ-ի կազմում զտնվող ստրուկտուրային զենների էքսպրեսիայի արգյունավետության բարձրացման համար: Ցույց է տրված, որ հնարավոր է սինթեզված պոլիպեպտիդների սեկրեցիան բակտերիալ պոլիպլազմայի մեջ: Ուսումնասիրված է CV 40 ռեկոմբինանտային ԴՆԹ-ի կազմի մեջ մտնող մի շարք էուկարիոտիկ ստրուկտուրալ զենների 4-ԴՆԹ-զենների էքսպրեսիան բջիջների կուլտուրայի մեջ: Կառուցված է արհեստական վիրուսանման մասնիկների նոր տիպ, որը կարող է օգտագործվել որպես զեն տեղափոխող սիստեմ էուկարիոտիկ բջիջների համար:

In vivo պայմաններում կառուցված են ռեկոմբինանտ ԴՆԹ բիոգեդրադաքիայի Sal Tol պլազմիդների հիման վրա: Այժմ ուսումնասիրվում են բացիլների արտաքրոմոսոմային զենները՝ նրանց նպատակաղղված տրանսֆորմաքիայի հնարավորության հարցի ներքո:

THE MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF RECOMBINANT DNA

R. A. ZAKHARYAN

Last achievements of gene engineering, cloning and expression in bacterial gene cell of some polypeptide hormone genes: proinsulin insulin, growth hormone somatomammotropin and ovalbumine have been generalized. Main methodic approaches to construction of recombinant DNA, including data on extrachromosomal genes in bacilli and biodegradation plasmids have been presented.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабян А. С., Захарян Р. А., Акопян С. М., Бакунц К. А., Исраелян Ю. А., Азарян Н. Г. Микробиология, 47, 1, 97, 1978.
2. Дебабов В. Г., Азизбеян Р. Р., Хлебашина О. Н., Дяченко В. В., Галушка И. П., Бельх Р. А. Генетика, 13, 496, 1977.
3. Захарян Р. А., Агабян А. С., Акопян С. М., Кочарян Ш. М., Боронин А. М. ДАН СССР, 232, 482, 1977.
4. Захарян Р. А., Агабян А. С., Акопян С. М., Гаспарян Н. С., Кочарян Ш. М. Биолог. ж. Армении, 31, 8, 818, 1978.
5. Захарян Р. А., Агабян А. С. Всесоюз. симп.: Молекулярные механизмы генетических процессов, 87, М., 1976.
6. Захарян Р. А., Агабян А. С., Чил-Акопян Л. А., Гаспарян Н. С., Бакунц К. А., Татевосян П. Е., Африкян Э. К. ДАН АрмССР, 63, 1, 42, 1976.
7. Захарян Р. А., Исраелян Ю. А., Агабян А. С., Татевосян П. Е., Акопян С. М., Африкян Э. К. Микробиология, 48, 2, 226, 1979.
8. Копылова-Свиридова Т. Н., Фодор И., Баев А. А. ДАН СССР, 245, 5, 1978.
9. Ксёндзенко В. Н., Комынина Т. П., Казанцев С. Н., Крюков В. М., Баев А. А. ДАН СССР, 248, 410, 1979.
10. Скрыбин Г. К., Головлева Л. А., Зякин А. М., Перцова Р. Н., Мурзхин Ю. В. ДАН СССР, 237, 512, 1977.
11. Скрыбин Г. К., Гаузе Г. Г., Томарев С. Н., Баев А. А. ДАН СССР, 241, 1220, 1978.
12. Солонин А. С., Тяншин В. Н., Баев А. А. ДАН СССР, 247, 320, 1979.
13. Aposhian V. N., Zakharian R. A. Advances in Enzyme Regulation, 18, 275, Perg. Press, 1980.
14. Aposhian V. N. Virology, 96, 656, 1979.
15. Backman K., Ptashne M. Cell, 13, 65, 1978.
16. Barry K. M., Allissow N., Skinner A. J., Cooper R. J. Gen. Microbiol., 110, 1, 1979.
17. Chakrabarty A. M., Friello D. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3410, 1974.
18. Chakrabarty A. M. Ann. Rev. Genet., 10, 7, 1976.
19. Chakrabarty A. M., Friello D. A., Bopp C. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3109, 1978.
20. Daggleyby C. J., Bayley S. A., Wersley M. J., Williams P. A., Broda P. A. J. Bacteriology, 130, 1274, 1977.
21. Dunn N. W., Gunsalus I. S. J. Bacteriol., 114, 974, 1973.
22. Ferrel R. G., Gunsalus I. S., Cauford I. P., Johnston I. B., Ito I. S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 411, 1978.
23. Faust R., Spizizen J., Gige V., Traubers R. S. J. of Invertebrate Pathology, 33, 233, 1979.
24. Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itamura K., Riggs S. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1, 106, 1979.
25. Heinary A. L., Daggleyby C. J., Broda P. A. Mol. Gen. Genet., 150, 147, 1978.
26. Johnston I. B., Gunsalus I. S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 13, 1977.
27. Palchoudhuri S., Chakrabarty A. M. J. Bacteriol., 125, 410, 1976.
28. Palchoudhuri S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 2, 1977.
29. Rielwald J. G., Chakrabarty A. M., Gunsalus I. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 855, 1973.
30. Richard C., Mulligan, Howard B. H., Berg P. Nature, 277, 103, 1979.
31. Roberts T. M., Kacich R., Ptashne M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5301, 1979.
32. Seeburg P. H., Shine J., Martial J. A., Ivarie R. D., Morris J. A., Ulrich A., Bakter J. D., Goodman H. M. Nature, 276, 795, 1978.
33. Shine J., Seeburg P. H., Martial J., Baxter J., Goodman H. M. Nature, 270, 494, 1977.

34. *Stahly D. P., Dingman D. W., Bulla L. A., Aronson A. I.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 84, 581, 1978.
35. *Thaker R., Rorving O., Kahlon P., Gunsalus I. C.* J. of Biochemistry, 289, 1978.
36. *Thomas H., Fraser, Barbara J. Bruce.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5936, 1978.
37. *Vilh-Komaroff L., Efstratladis A., Broome S., Lomedice P., Tirard R., Naber S. P., Chick W., Gilbert W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 8, 3727, 1978.