

УДК 577.21

СУБКЛОНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ГЕНОМА ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА

Н. С. АМБАРЦУМЯН, А. Г. ТАТОСЯН

В плазмиде pBR 322 получены фрагменты ДНК вируса саркомы Рауса, несущие гены gag, pol, src и длинный концевой повтор провирусной ДНК, содержащий регуляторные участки генома вируса.

Ключевые слова: молекулярное клонирование, вирус саркомы Рауса, субклоны.

Вирусы саркомы птиц относятся к классу ретровирусов, геном которых состоит из 2 идентичных молекул РНК длиной в 10000 нуклеотидов [4]. Вирус саркомы Рауса (ВСР), штамм Прага С, относится к числу недефектных ретровирусов, несущих в своем геноме, помимо всех генов, необходимых для воспроизводства вируса, также и ген src, обеспечивающий онкогенный потенциал вируса. После заражения чувствительных клеток вирусная РНК транскрибируется в двуспиральную провирусную ДНК. Транскрипция осуществляется ферментом, находящимся в вирионе, обратной транскриптазой, или ревертазой, который кодируется вирусным геном pol [2]. В результате обратной транскрипции образуется кольцевая или линейная молекула ДНК, фланкированная по концам длинными концевыми повторами (ДКП), происходящими как с 3'-, так и с 5'- конца геномной РНК ВСР [9, 12, 13].

Из клеток после заражения вирусом можно выделить как кольцевые, так и линейные формы провирусной ДНК. Однако получить достаточное для исследований количество такой ДНК не представляется возможным. В последнее время достигнуты значительные успехи в этой области благодаря разработке методов геной инженерии [5, 7, 8]. Ранее нами было проведено молекулярное клонирование крупных фрагментов генома ВСР, штамм Прага С, в плазмиде pBR 322 [1].

В настоящей работе описано получение из плазмид, содержащих крупные фрагменты ДНК ВСР, субклонов, несущих отдельные гены ВСР. Особый интерес представляет получение субклона, содержащего ДКП в непермутированной форме, так как известно, что регуляторные участки, содержащиеся в этом фрагменте ДНК, способны направлять транскрипцию как в эукариотической, так и в прокариотической клетке [11].

Материал и методика. Клетки *E. coli* χ 1776, любезно предоставленные д-ром Куртисом (США), выращивали на LB-агаре или на жидкой L-среде. Использовали плазмиды pPrC11 [1], pSRA-2 [5] и pBR 322. Трансформированные плазмидами клетки подрачивали в той же среде в присутствии 40 мкг/мл ампициллина.

Рестрикционные эндонуклеазы HindIII, EcoRI, BglII, PstI, BamHI, SalGI и ДНК-лигаза T4 любезно предоставлены А. А. Янулайтисом (Институт прикладной энзимологии Главмикробиопроба, г. Вильнюс).

Плазмиды выделяли методом щелочной экстракции [3]. Размер и ориентацию вставок вирусной ДНК в рекомбинантных плаزمидах определяли электрофорезом ДНК до и после ее расщепления различными рестриктазами с известными сайтами расщепления на молекуле провирусной ДНК ВСП [12]. Электрофорез вели в 1%-ном агарозном пластинчатом геле, 15×10×0,3 см, в буфере, содержащем 40 мМ CH₃COONa, 40 мМ Трис CH₃COOH, 1 мМ ЭДТА. Полученные фрагменты анализировали после окраски геля бромидом этидия. Фрагменты ДНК нужного размера элюировали из геля методом электроэлюции [10].

Расщепление соответствующими рестриктазами исходных плазмидных ДНК проводили в инкубационной среде, содержащей 7 мМ Трис HCl, pH 7,5, 7 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотрептола и 50 мМ NaCl, при 37°, в течение 1 часа. После инкубации препарат прогревали в течение 10 мин при 65° для инактивации фермента. К расщепленной ДНК добавляли ДНК плазмиды pBR 322, предварительно расщепленной соответствующей рестриктазой.

Лигирование вели в буфере, содержащем 50 мМ Трис HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 7 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрептола, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мкМ АТФ. На 1 мкг ДНК добавляли 2 единицы активности лигазы. Инкубировали 12—16 ч при 12,5°.

Трансформацию клеток *E. coli* χ 1776 проводили по методу, описанному ранее [6]. Эффективность трансформации определяли по количеству колоний, выросших на чашках с LB-агаром, содержащим ампициллин. Трансформанты тестировали отбором по фенотипу и последующим анализом ДНК рекомбинантных плазмид рестрикционным картированием.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведена структура генома ВСП. 35 S геномная РНК содержит информацию о трех вирусных генах: ген *gag*, кодирующий внутренние белки вириона, *pol*, кодирующий об-

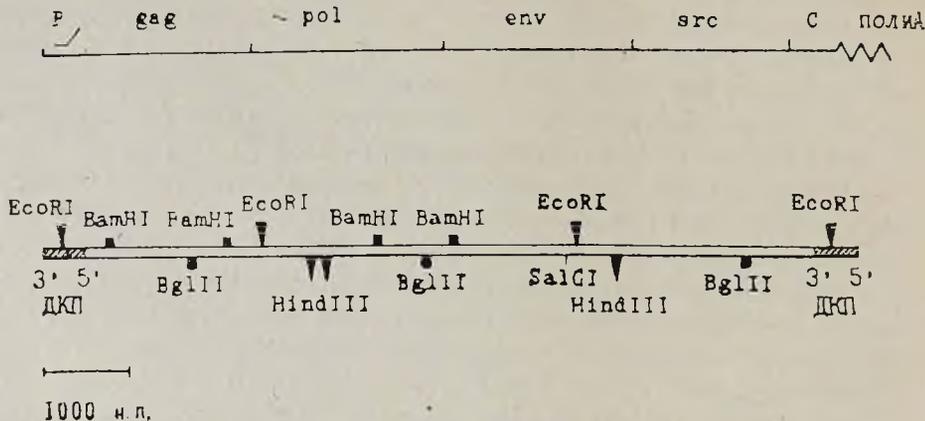


Рис. 1. Схематическое изображение генома вируса саркомы Рауса. а. Карта 35S геномной РНК вируса, б. рестрикционная карта линейной провирусной ДНК ВСП, содержащей 2 длинных концевых повтора. Р — праймер.

ратную транскриптазу ВСП, и *env*, кодирующий гликопротеин оболочки. На 3'-конце генома ВСП локализован ген, имеющий клеточное происхождение и определяющий онкогенный потенциал вируса — ген *src*. После гена *src* перед поли(А) последовательностью локализован не-транслируемый консервативный С-участок генома. На рис. 1 б) приведена рестрикционная карта провирусной ДНК ВСП, на которой обозначены участки гидролиза рестриктазами, использованными в работе. В качестве исходного материала для получения большинства субклонов

использовали рекомбинантную плазмиду pPrC11, содержащую вставку вирусных последовательностей длиной в 6000 нуклеотидов. Структура pPrC11 приведена на рис. 2а.

На рис. 2б приведено электрофоретическое разделение фрагментов ДНК pPrC11 после гидролиза рестриктазой EcoRI. Наличие фрагментов длиной в 2,4 и 2,9 тысяч нуклеотидных пар указывает на присутствие в плазмиде pPrC11 генов src и gag ВСР (см. для сравнения рис. 1).

Схема получения субклонов psrcС и pgagС приведена на рис. 2а. Для получения плазмиды psrcС исходную плазмиду pPrC11 рестрицировали рестриктазами HindIII и EcoRI и полученные фрагменты лигировали с плазмидой pBR 322, предварительно обработанной теми же ферментами. Полученными рекомбинантными молекулами трансформировали клетки *E. coli*. Рекомбинанты отбирали по фенотипу A_p^B , T_c^s .

Рестрикционный анализ отобранных клонов показал, что при рестрикции ДНК рекомбинантных плазмид ферментами EcoRI и HindIII образуются фрагменты ДНК длиной в 4200 и 3200 нуклеотидных пар, а при одновременной рестрикции ферментами EcoRI, HindIII и BglII образуются фрагменты ДНК длиной в 4200, 1700 и 1600 нуклеотидных пар (рис. 2б). Сопоставление размеров полученных фрагментов с теоретически ожидаемыми, исходя из рестрикционной карты ВСР, указывает на то, что в данном клоне psrcС содержится встроенный в pBR 322 фрагмент, содержащий ген src ВСР. Для получения субклона pgagС фрагмент ДНК длиной в 2400 нуклеотидных пар, образованный после рестрикции pPrC11 EcoRI, элюировали из геля и лигировали с предварительно рестрицированной по EcoRI плазмидой pBR 322. После трансформации клеток *E. coli* и анализа полученных клонов выяснилось, что плазида pgagС содержит в своем составе ген gag ВСР.

Из рестрикционной карты клона pPrC11, приведенной на рис. 3, видно, что при рестрикции EcoRI образуется фрагмент длиной в 350 нуклеотидов, в котором 5'- и 3'- части ДКП находятся в переставленной, пермутированной форме. Однако для изучения активности промотора, содержащегося в ДКП, и его дальнейшего использования необходимо иметь последовательности ДКП в непермутированной форме. Получение такого субклона проводили по схеме, приведенной на рис. 3.

Клон pPrC11 рестрицировали ферментом BamHI, затем проводили лигирование при сильном понижении концентрации ДНК (1—2 мкг/мл). Лигирование в таких условиях приводит к преимущественному замыканию молекул ДНК на самих себя. После трансформации были отобраны клоны, один из которых, названный psLTRC, содержал плазмиду, имеющую структуру, приведенную на рис. 3. На рис. 4 приведен рестрикционный анализ ДНК плазмиды psLTRC ферментами HindIII и EcoRI, подтверждающий эту структуру. Далее ДНК psLTRC гидролизовали EcoRI с таким расчетом, чтобы на каждую молекулу приходилось не более 2 ударов фермента. Полученную смесь недорестриктированных разделяли в 1%-ном агарозном геле и элюировали из него зону ДНК, соответствующую по длине 5000 нуклеотидных пар, которая, по теоретическим расчетам, должна была содержать ДКП в непермутированной

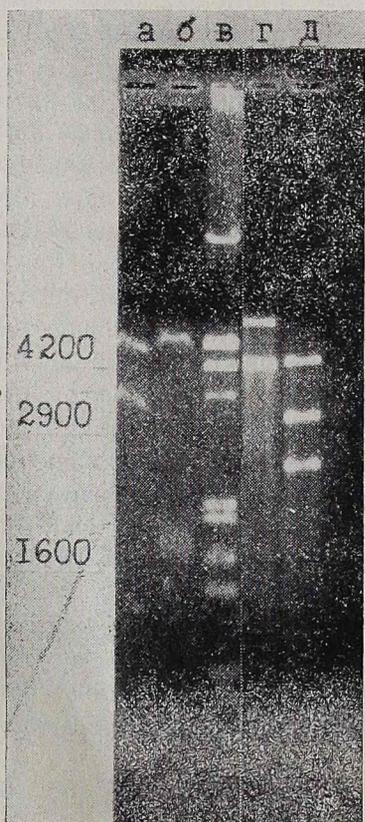
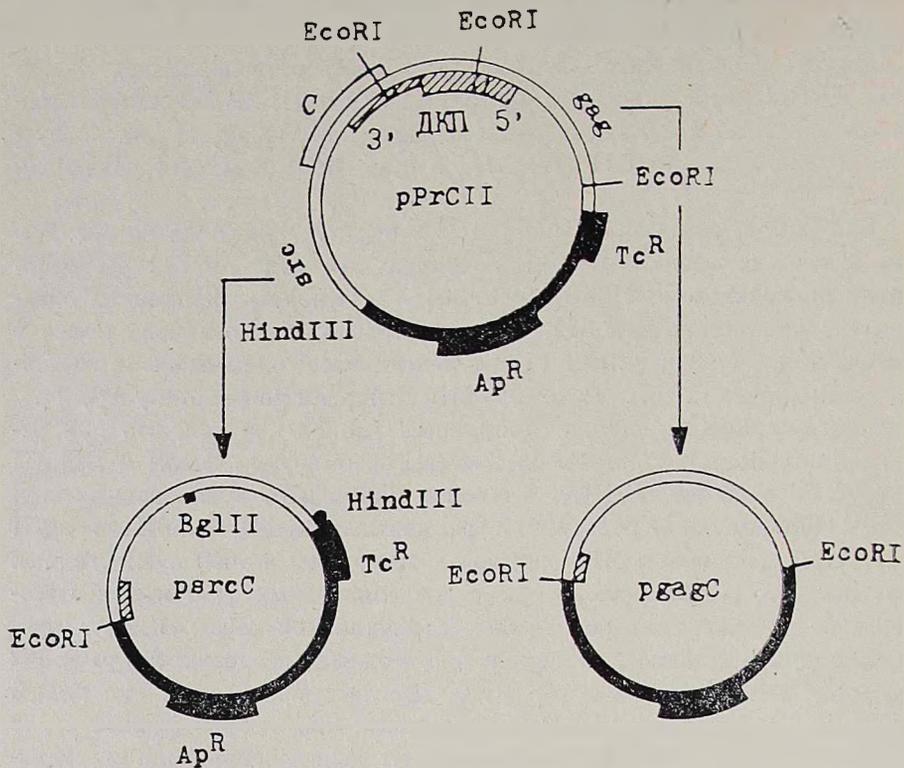


Рис. 2. Получение субклонов, содержащих гены gag и src ВСП. а. схематическое изображение исходной плазмиды и получения субклонов; б. электрофоретический анализ рестриктивных фрагментов исходной плазмиды pPrCII и субклона psrcC. На фото. а. psrcC, рестрицированная по EcoRI + HindIII; б. то же, рестрикция по EcoRI + HindIII + BglII; в. маркер ДНК фага λ , рестрицированная по EcoRI + HindIII; г. pPrCII, рестрицированная по HindIII; д. pPrCII, рестрицированная EcoRI + HindIII.

форме. Элюированный фрагмент лигировали и трансформировали им клетки *E. coli*. Отбирали трансформанты с фенотипом Ap^R Tc^s . Плазмиды, выделенные из клонов, анализировали далее рестрикцией ДНК

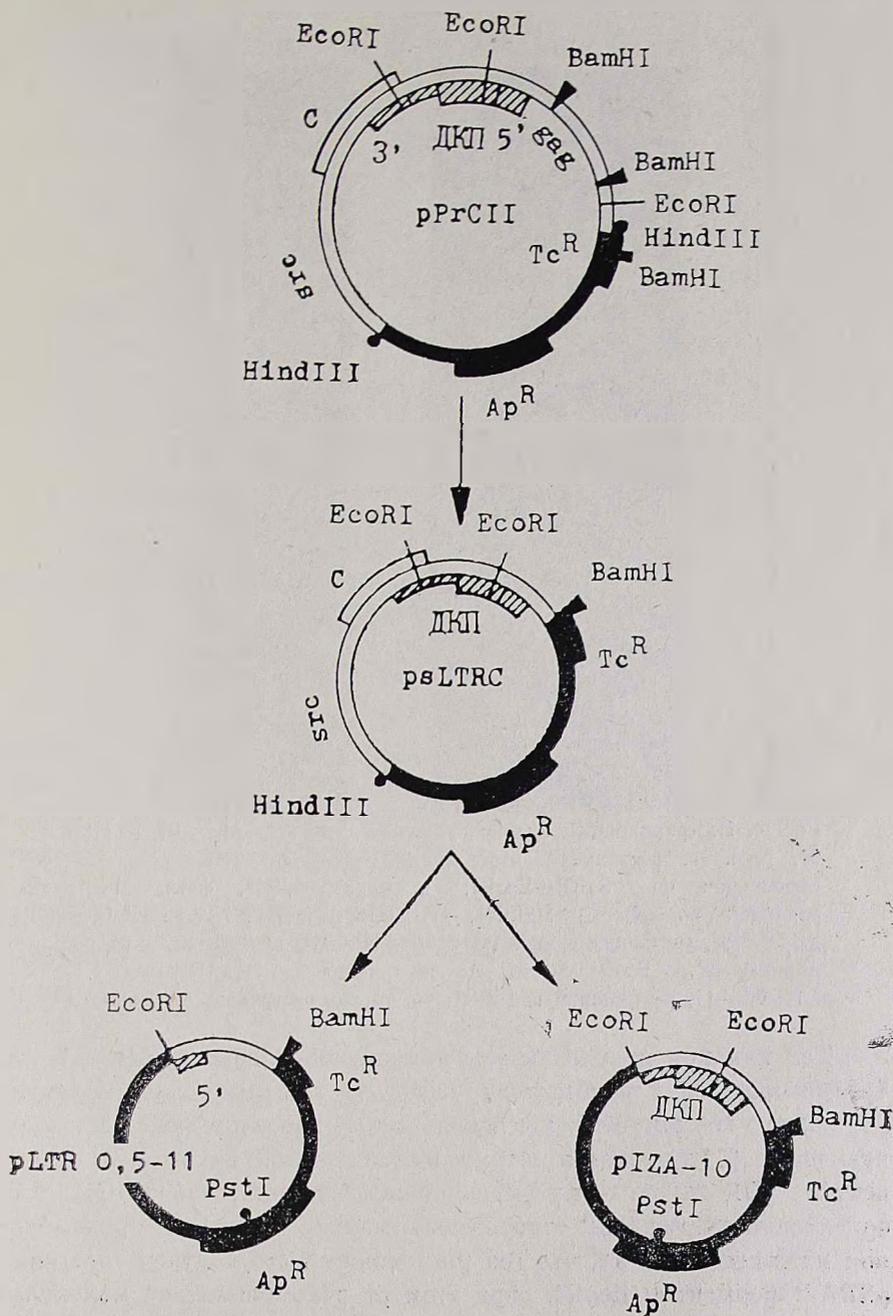


Рис. 3. Схема получения рекомбинантных плазмид pLZA-10 и pLZR 0,5-11:

по **EcoRI**. Для дальнейшей работы были отобраны 2 клона, pLZR-0,5-11 и pLZA-10, рестриктные карты которых приведены на рис. 3.

На рис. 4 приведено электрофоретическое распределение фрагментов ДНК этих плазмид, полученных в результате рестрикции **EcoRI**,

BamHI и PstI. Видно, что клон рLTR-0,5-11 содержит только 3'-концевую часть ДКП, а клон рlZA-10—полную структуру непермутированного ДКП ВСР.

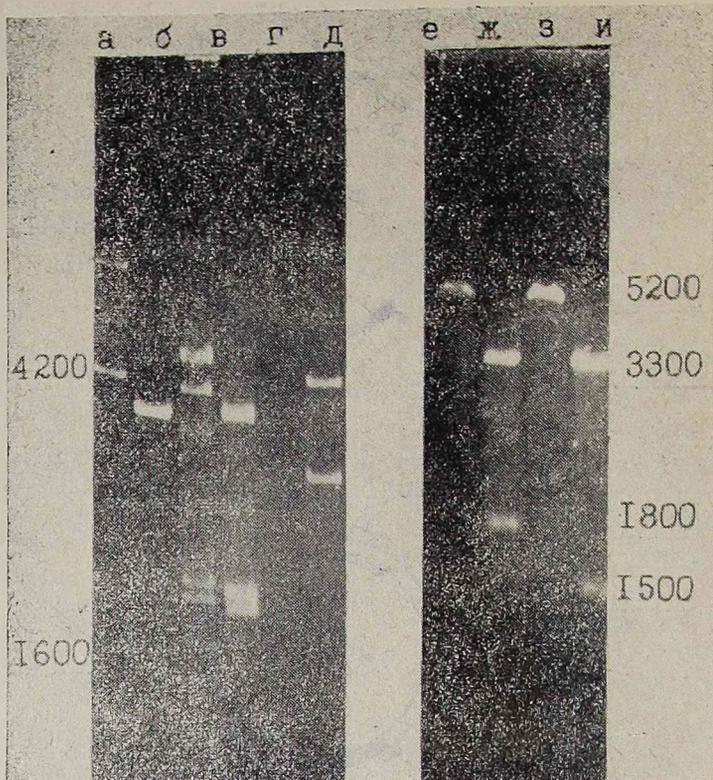


Рис. 4. Рестрикционный анализ субклонов рSLTRC, рlZA-10, рLTR 0,5—11, рроl. а. рестрикция рSRA-2 по SalGI, б. ДНК рроl, рестрицированная по SalGI+EcoRI; в. маркер ДНК фага, рестрицированная по EcoRI+HindIII; г. ДНК рроl—SalGI+EcoRI+BglII; д. рSLTRC, рестрицированная по EcoRI+HindIII; е. ДНК рlZA-10, рестрицированная по EcoRI; ж. то же—рестрикция по BamHI+PstI; з. ДНК рLTR 0,5—11, рестрикция по EcoRI; и. то же, рестрикция по BamHI+PstI.

Так как при получении рекомбинантной плазмиды рРгС11 структурная часть гена *pol* была нарушена, то для получения субклона, содержащего ген *pol* ВСР, мы использовали плазмиду рSRA-2, полученную ранее [5] и любезно нам предоставленную. Геном ВСР встроен в вектор рBR 322 по сайту расщепления рестриктазой SalGI. Анализ ориентации генома ВСР относительно маркеров вектора в рекомбинантной плазмиде показал, что ген *pol* может быть получен рестрикцией рSRA-2 ферментом EcoRI, при этом от рекомбинантной молекулы отбрасываются фрагменты, несущие другие гены, с последующим лигированием и трансформацией такой ДНК клеток *E. coli*. После трансформации отбирали клоны, имеющие фенотип Ap^R Tc^s . Клоны анализировали рестрикцией плазмидной ДНК по SalGI, EcoRI и BglII. При такой тройной рестрикции образуются фрагменты длиной в 3800, 1300 и 2400 нуклеотидных пар. Подобного размера фрагменты могут образо-

вываться только в том случае, если в рекомбинантной плазмиде содержится ген *pol* ВСР (рис. 4).

В результате проведенной работы получены рекомбинантные плазмиды, содержащие отдельные гены ВСР—*gag*, *pol* и *src*, а также плазмиды, названная *p1ZA-10*, содержащая ДКП ВСР и нетранслируемый участок перед геном *gag* ВСР. Этот субклон может рассматриваться как потенциальный вектор, опоспособный направлять транскрипцию и трансляцию встроенного гена как в прокариотических, так и в эукариотических клетках [11]. Нетранслируемая зона перед геном *gag* ВСР предположительно содержит участок, ответственный за интеграцию провируса ВСР в геном клетки-хозяина. Таким образом, не исключена возможность интеграции полученных на основе этого вектора рекомбинантов в геном клетки-хозяина.

Полученные субклоны используются для анализа интеграции и экспрессии отдельных вирусных генов и онкогена *src* в клетках млекопитающих, трансформированных ВСР, а также нормальных и неопластических тканей человека.

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР,

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР

Поступило 29.XII 1983 г.

ՌԵԿՈՄԲԻՆԱՆՏ ԲՆԵՄՈՒՄԻ ԳԵՆՆԵՐԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿԱԿ ՍԿՏԻՎ
ՖՐԱԳՄԵՆՏՆԵՐԸ ԵՎ ԳԵՆԵՐ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ՍՈՒԲԿԼՈՆՆԵՐԸ

Ն. Ս. ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ, Ա. Գ. ԹԱՏՈՍՅԱՆ

pBR322 պլազմիդում ստացված է Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի ԴՆԹ-ի ֆրագմենտ, որը կրում է *gag*, *pol*, *src* գեները և պրովիրալ տերմինալ ԴՆԹ-ի երկար ծայրային կրկնութուն՝ վիրուսի գենոմի կարգավորիչ մասերի պարունակությունը:

SUBCLONES, CONTAINING GENES AND FUNCTIONALLY
ACTIVE FRAGMENTS OF ROUS SARCOMA VIRUS GENOME

N. S. AMBARTSUMYAN, A. G. TATOSYAN

In plasmid *pBR322* Rous Sarcoma Virus DNA fragments have been subcloned containing *gag*, *pol* and *src* genes, and proviral long terminal repeat, which contains regulatory sections of viral genome.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амбарцумян Н. С., Татосян А. Г., Ениколопов Г. Н. Мол. биол., 16, 1183—1187, 1982.
2. Киселев Л. Л. Итоги науки и техники. М., 1978.
3. Birnboim H., Doly J. Nucl. Acids Res., 7, 1513—1522, 1979.
4. Bishop J. M. Ann. Rev. Biochem., 47, 35—88. 1978.
5. DeLorbe W. J., Luciv P. A., Goodman H. M., Varmus H. E., Bishop J. M. J. Virol., 36, 50—61, 1980.
6. Bolivar F., Backman K. Methods in Enzymology, 68, 245—267, 1979.
7. Guntaka R. V., Mitsialis S. A. Gene, 12, 113—121, 1980.

8. Highfield P. E., Rafield L. F., Gilmer T. M., Parsons T. G. L. J. Virol., 36, 271—279, 1980.
9. Hsu W., Sabran J. L., Mark J. E., Guntaka R. N., Taylor J. M. J. Virol., 28, 810—818, 1978.
10. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. In: Molecular Cloning Cold Spring Harbour Lab., 1982.
11. Mitsialis S. A., Young J. F., Palese P., Guntaka R. V. Gene, 16, 217—225, 1981.
12. Shank P. R., Hughes S. H., Kung H. J., Majors J. E., Quintrell N., Guntaka R. V., Bishop J. M., Varmus H. E. Cell, 15, 1383—1395, 1978.
13. Shank P. R., Varmus H. E. J. Virol., 25, 104—114, 1978.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 8, 1984

УДК 575.2.633.11

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОМБИНАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ МУТАНТОВ ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГОДА ВЫРАЩИВАНИЯ

Г. А. СААҚЯՆ, А. А. САРКИСՅԱՆ

Приведены результаты изучения общей и специфической комбинационной способности мутантов озимой мягкой пшеницы по схеме диаллельных скрещиваний. В зависимости от года выращивания гибридов по всем изученным признакам установлена довольно высокая стабильность проявления общей комбинационной способности по сравнению со специфической. Получены сравнительно высокие и стабильные коэффициенты наследуемости, позволяющие прогнозировать эффект селекции по изученным признакам.

Ключевые слова: пшеница, мутанты.

Комбинационная способность является генетически обусловленным свойством и, как все сложные признаки, в значительной степени зависит от условий среды [6, 7]. Установлено, что общая комбинационная способность (ОКС) компонентов скрещивания, по сравнению со специфической (СКС), является более устойчивым признаком и в меньшей степени зависит от места и года испытания [2—5, 8]. Исходя из этого, для получения надежных данных по СКС испытание гибридов желательно проводить в различных условиях среды и, по мере возможности, более длительное время. Статистические методы определения комбинационной способности компонентов скрещивания позволяют проследить характер изменчивости действия генов, ответственных за степень развития количественных признаков, в зависимости от условий выращивания гибридов.

С целью изучения изменчивости комбинационной способности мутантов озимой мягкой пшеницы испытание гибридов от неполных диаллельных скрещиваний проводили в различные годы.