

1. Дубейковский А. Н., Каменева С. В. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 8, 18—22, 1983.
2. Каменева С. В., Поливцева Т. И., Коптева А. В., Муролец Е. М. Генетика, 18, 9, 1433—1441, 1982.
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976.
4. Миронов В. И., Слущкий А. М., Гордеев В. К. В сб. Метаболические плазмиды. Тез. докл. Всесоюзн. конф., 157. Таллин, 1982.
5. Степанов А. Н. Автореф. докт. дисс., М., 1979.
6. Barth P. T., Grinter N. J., Bradley D. E. J. Bacteriol., 133, 43—52, 1978.
7. Holmes D. S., Quigley M. Analyt. Biochem., 114, 193—197, 1981.
8. Miller L., Kaplan S. Arch. Biochem. and Biophys., 187, 229—235, 1978.
9. Morgan A. F. J. Bacteriol., 144, 654—661, 1982.
10. Olsen R. H., Shibley P. J. Bacteriol., 113, 772—780, 1973.
11. Pemberton J. M., Bowen A. R. J. Bacteriol., 117, 110—117, 1981.
12. Pühler A., Aguilari M. O., Hynes M., Muller P., Klipp W., Prieter U., Simon R., Weber G. In: Advances in Nitrogen Fixation Research, Ed. Veeger C., Newton W. E., 609—619, 1984.
13. Ststrom W. R. J. Bacteriol., 31, 526—532, 1977.
14. Tucker W. T., Pemberton J. M. FEMS Microbiol. Letters, 5, 173—176, 1979.
15. Tucker W. T., Pemberton J. M. FEMS Microbiol. Letters, 5, 215—217, 1979.

«Биолог. Армения», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.113.576.858.9

ТРАНСПОЗИЦИЯ ГЕНОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Э. С. ПИРУЗЯН

Обобщены некоторые данные в области исследования транспозиции ДНК бактериофага *Mu* и переноса и интеграции фрагмента бактериальной ДНК (Т-ДНК опухолеобразующей Т1-плазмиды агробактерий) в хромосомы растений. Основное внимание уделяется вопросу получения мини-производных фага *Mu* и конструированию на их основе интегративных векторов у прокариот. Процесс опухолеобразования у растений рассматривается в аспекте применения векторов—производных Т1-плазмиды для переноса чужеродных генов в растительные клетки.

Ключевые слова: гениная инженерия, транспозиция генов, бактериофаг *Mu*, Т1-плазмиды агробактерий, конструирование векторов.

Понятие «нестабильность генома» отражает явление транспозиции (миграции) определенных сегментов ДНК [10]. Смысл нестабильности генома заключается прежде всего в том, что в результате перемещения отдельных мигрирующих элементов ДНК и внедрения их в новые сайты происходит нарушение последовательности нуклеотидов в гене и возникает мутация. Таким образом, транспозоны играют большую роль в эволюционном процессе.

Впервые гены, названные автором открытия В. Мак Клинтон «контролирующими» элементами, были открыты у кукурузы [17, 18]. Затем были выявлены транспозоны (Tn) и инсерционные последовательности (IS) у бактерий. Существенный скачок в исследовании природы транспозонов был сделан после открытия уникального бактериофага Mu, оказавшегося представителем класса транспозируемых элементов [24].

Транспозиция ДНК и бактериофага Mu. Способность фага Mu к интеграции практически в любой сайт любого бактериального гена свидетельствует о его высокой мутагенности, что и обусловило его название Mu (от Mutator). После заражения бактериальных клеток фагом Mu фаговая ДНК встраивается в хозяйскую ДНК, затем в процессе размножения фага образовавшиеся копии ДНК Mu перемещаются в различные участки бактериальной ДНК, вызывая при этом мутации в бактериальных генах. В процессе перемещения копий ДНК Mu фаг может «захватывать» и перемещать вместе со своими копиями и гены самой бактерии, тем самым осуществляя генетическую инженерия бактерий *in vivo* [3, 11, 16, 24].

Работа с бактериофагом Mu в нашей стране была впервые начата в лаборатории, руководимой проф. С. П. Алиханяном в ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Основное внимание в генетических исследованиях с бактериофагом Mu уделяется изучению механизма перемещения копий ДНК Mu и расшифровке генетического контроля транспозиции. Согласно моделям, разработанным для объяснения механизма транспозиции [12, 23], процесс перемещения сегментов ДНК является многоступенчатым, в него вовлекается ряд ферментных систем. Акт транспозиции включает такие этапы, как разрезание и сшивку ДНК мишени, репликацию транспозируемого элемента и сайтспецифическую рекомбинацию. Цикл развития Mu включает интеграцию в хозяйскую хромосому, дупликацию его генома, реинтеграцию новых копий генома Mu в новые сайты бактериальной ДНК. Поэтому трудно допустить, что вся генетическая информация, контролирующая процесс миграции копий, содержится лишь в геноме Mu.

Действительно, в процессе транспозиции копий Mu участвуют некоторые гены *E. coli*, функция которых необходима для осуществления нормальной репликации самой бактериальной ДНК (dna). К числу генов *E. coli*, влияющих на процесс транспозиции Mu, относятся также гены *himA*, *himB* и *hir*, осуществляющие сайтспецифическую рекомбинацию фага λ . Тем не менее вопрос о генетическом контроле транспозиции Mu со стороны бактериального генома остается открытым, поскольку решение его упирается в проблему отбора соответствующих бактериальных мутантов и отсутствия прямых методов их селекции. Нами разработаны методы прямого отбора мутантов *E. coli*, в которых нарушена транспозиция Mu [2, 5]. Использование этих методов привело к выделению мутаций у *E. coli*, исключающих развитие фага Mu [1, 9].

Фаг Ми может служить основой при конструировании универсального вектора для клонирования генов благодаря его способности интегрироваться в случайные сайты ДНК хозяйской клетки и амплификации фагового генома. Основным условием такого конструирования должно быть получение делеционных вариантов Ми, так называемых мини-Ми фагов. Смысл создания мини-Ми фагов заключается в получении в фаговом геноме обширных центральных делеций при сохранении интактных концов фагового генома, необходимых для осуществления нормальной репликации и транспозиции фаговой ДНК. Такие мини-Ми фаги были получены в ряде лабораторий [6, 13, 22, 25]. Полученная нами коллекция мини-Ми фагов включает различные делеционные производные, в том числе фаг, размер генома которого составляет всего лишь 4,4 т. н. н. (размер генома фага Ми 37 т. н. н.). На основе одного из полученных мини-Ми фагов был сконструирован универсальный интегрирующийся вектор, способный давать пятикратное увеличение копий клонируемого гена в клетках *E. coli*.

Следует подчеркнуть еще одно уникальное свойство бактериофага Ми — способность осуществлять транспозицию в клетках более чем 20-ти различных видов микроорганизмов. Круг естественных хозяев этого фага ограничен лишь некоторыми представителями семейства *Enterobacteriaceae* [14, 15]. Однако, будучи интегрированным в плазмиду RP4, имеющую чрезвычайно широкий круг хозяев, фаг Ми был перенесен в клетки различных видов микроорганизмов. Во всех изученных случаях с клетками грамотрицательных бактерий после преодоления адсорбционного барьера геном Ми в новом генетическом окружении транскрибировался и транслировался, хотя кинетика фагового развития в ряде случаев оказывалась измененной [20].

В клетках *E. coli* удалось также осуществить интеграцию фага Ми в клонированные гены хлоропластов гороха [21].

Перенос T-ДНК опухолеродных бактерий в растительные клетки. Уникальный механизм переноса фрагмента ДНК бактериального происхождения в клетки высших растений имеет место в случае образования опухолей. Генетика опухолеродных Ti-плазмид (от Tumor-inducing) *Agrobacterium tumefaciens* и возможность применения этой системы для генетической инженерии растений подробно обсуждаются в монографии [4]. Остановимся лишь на основных положениях этого необычного генетического процесса. Возможность использования Ti-плазмид *A. tumefaciens* в качестве векторов для генетической инженерии высших растений основана на том, что определенный фрагмент этой плазмиды — T-ДНК (Transfer DNA) переносится и стабильно интегрируется в хромосому растения. Таким образом, в этом, пока еще единственном хорошо изученном случае преодолевается естественный барьер, установленный самой природой между прокариотами и высшими организмами — тем, чтобы предотвратить обмен генами между ними. Такая настройка чужеродной ДНК приводит к тому, что нормальная растительная клетка перерождается (трансформируется) в раковую. Это свойство пере-

дается всем потомкам трансформированной клетки, и начинается не контролируемое растительным организмом деление клеток, в результате чего образуется опухоль, называемая корончатым галлом.

Генетическое изучение Ti-плазмид затруднено из-за их больших размеров, а также неспособности реплицироваться в клетках *E. coli*, в которых упрощаются манипуляции с плазмидными ДНК. Поэтому весьма важным является клонирование отдельных фрагментов Ti-плазмиды.

Наша работа была начата с получения банка клонов, содержащих различные районы ДНК Ti плазмиды непалинового типа (pTi C58) с молекулярным весом 132 мегадалтон. Всего получено 210 рекомбинантных клонов с EcoRI-фрагментами и 160 клонов с HindIII-фрагментами, что в сумме в несколько раз превышает общее количество фрагментов pTi C58 и дает основание считать, что геном pTi C58 полностью перекрывается полученным банком клонов [7, 8.]

Использование одного из фрагментов (HindIII-13) в качестве зонда позволило идентифицировать область начала репликации непалиновой плазмиды pTi C58 и провести мутагенизацию этой области транспозонами для детального генетического анализа.

Процесс образования корончатых галлов у растений, в основе которого лежит миграция фрагмента бактериальной ДНК в растительную клетку, представляет собой, таким образом, природную форму генетической инженерии растений. В настоящее время этот процесс используется как основа для экспериментального переноса чужеродных генов любого происхождения в растения. Так, например, осуществлен успешный перенос гена фазеолина (запасного белка) бобов в подсолнечник и получено химерное растение—подсолнечник, в клетках которого экспрессируется ген другого (неродственного) растения [19].

При рассмотрении возможности использования Ti-плазмид для переноса новых генов в растения существенным является то, что для образования опухолей важна не вся Т-ДНК Ti-плазмиды целиком, а только определенные районы Т-ДНК. Следовательно, утрата остальных ее участков или встройка в них «чужих» генов, которые желательно передать в растение, не мешают процессу опухолеобразования. Единственным условием при этом является сохранение коротких сегментов ДНК слева и справа от Т-области, с помощью которых она транспозирована в растительную хромосому, и сохранение функций Т-ДНК, существенных для процесса внедрения. Таким образом, если Т-ДНК несет в своем составе «чужой» для растения ген, то он также окажется встроенным в хромосому растения, и когда с сигналов узнавания будет считываться информация, заключенная в Т-ДНК, начнет функционировать и чужеродный ген, перенесенный в растительную клетку.

Для успешного осуществления генетической инженерии на растениях имеется еще много трудностей, однако уже первые успехи на этом пути свидетельствуют о больших возможностях экспериментального переноса генов с помощью Ti-плазмид *A. tumefaciens*.

Է. Ս. ՓԻՐՈՒԶՅԱՆ

Հոդվածում ընդհանրացված են տվյալները, որոնք վերաբերում են *Mu* բակտերիոֆագի ԳնՖ-ի տրանսպոզիցիայի, ինչպես նաև բույսերի բրոմոսոմենրում բակտերիալ ԳնՖ-ի հասվածի (Մի պլազմիդի) տեղափոխման և ինտեգրացման ուսումնասիրմանը: Ուշադրություն է դարձված նաև *Mu* ֆագի մինիաժանցյալների ստացման և դրանց հիման վրա պրոկարիոտների մոտ ինտեգրատիվ վեկտորների ստեղծման հարցերին: Բույսերի մոտ ուռուցքառաջացման պրոցեսը դիտվում է որպես Մի պլազմիդների հիման վրա ստացված վեկտորների օգնությամբ օտարածին գեները բուսական բջիջներ տեղափոխելու միջոց:

TRANSPOSITION OF GENES IN BACTERIAL AND PLANT CELLS

E. S. PIRUZIAN

Specific peculiarities of the temperate bacteriophage *Mu* genetics and its ability to accomplish the transposition of bacterial genes are discussed. Bacteriophage *Mu* has a unique integration system which favours the integration of *Mu*-genome and circular forms of foreign DNA into the bacterial chromosome and plasmids.

The system of transfer and integration of T-DNA of T1 plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* and the application of this system for genetic engineering of plants are also discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Великодворская Г. А., Абдрашимова А. И., Миркин С. М., Мосигов М. А., Пирюзян Э. С. Мол. генетика, микробиол. и вирусол., 6, 15, 1985.
2. Мосигов М. А., Великодворская Г. А., Павлова Г. В., Пирюзян Э. С. Мол. генетика, микробиол., и вирусол., 2, 20, 1984.
3. Пирюзян Э. С. Генетика, 15, 7, 1979.
4. Пирюзян Э. С., Андрианов В. М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.
5. Пирюзян Э. С., Корецкая Н. Г. Генетика, 19, 744, 1983.
6. Пирюзян Э. С., Мосигов М. А., Великодворская Г. А. Генетика, 20, 5, 1984.
7. Пирюзян Э. С., Стехин Н. И., Андрианов В. М. Докл. АН СССР, 273, 1249, 1983.
8. Стехин Н. И., Андрианов В. М., Пирюзян Э. С. Мол. генетика, микробиол. и вирусол., 4, 19, 1981.
9. Угмал М. Р., Кобец Н. С., Ильяна Т. С., Пирюзян Э. С. Генетика, 20, 924, 1981.
10. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М., 1984.
11. Bukhari A. J. Annu. Rev. Genet., 10, 389, 1976.
12. Bukhari A. J. In: Genetic Interaction and gene transfer, Brookhaven Symp., 218, 1977.
13. Chaconas J., de Bruijn F., Casatubal M. J. et al. Gene, 13, 37, 1981.
14. de Graaff J., Stouthamer A. H. J. Gen. Microb., 67, 91, 1971.
15. de Graaff J., Kreuning P. C., van de Putte P. Molec. Gen. Genet., 123, 283, 1973.
16. Howe M., Bade E. Science, 190, 624, 1975.
17. McClintock B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 28, 458, 1942.
18. McClintock B. Carnegie Inst. Wash. Yb., 45, 176, 1946.

19. Murray N., Sutton D. W., Murray M. G. et al. *Science*, 222, 476, 1983.
20. Murooka Y., Takizawa N., Harada T. II. *J. Bacteriol.* 145, 358, 1981.
21. Piruzian E., Andrianov V. et al. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45, 365, 1981.
22. Resibois A., Toussaint A., van Gijsegem F., Faelen M. *Gene*, 14, 103, 1981.
23. Shapiro J. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 1933, 1979.
24. Taylor A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 50, 1043, 1963.
25. van Leerdam E., Goosen T., Plasterk R., van de Putte P. *Gene*, 13, 111, 1981.

«Биолог. ж. Армении», т. XXVIII, № 11, 1985

УДК [577.214.622:577.152.41:579.842.24]:579.812.11

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ПЕКТАТЛИАЗЫ ERWINIA CHRYSANTHEMI В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI

И. О. БУКАНОВ, М. Ю. ФОНШТЕПН, А. И. КАРАСИН, О. А. ТОЛМАЧЕВ,

С. И. АЛИХАНИЯ, Н. К. ЯНКОВСКИИ

Гены пектатлиазы (ptI) штамма *E. chrysanthemi* ENA49 клонировали в клетках *Escherichia coli* на фаговом векторе λ 47.1. Гибридизационный анализ показал, что гены ptI тесно сцеплены и локализованы на EcoRI-фрагменте хромосомной ДНК *E. chrysanthemi* протяженностью 7,3 т. п. н. Фрагменты ДНК, содержащие гены ptI, а также прилегающие к ним области хромосомы *E. chrysanthemi* ENA49 клонировали на фагово-плазмидном векторе. Проведены субклонирования генов ptI на многокопийной плазмиде pUC19.

Ключевые слова: генная инженерия, пектатлиаза, молекулярное клонирование, экспрессия гена.

Фитопатогенные бактерии рода *Erwinia* секретируют во внеклеточное пространство ряд пектолитических ферментов, которые разрушают первичную стенку растительных клеток и вызывают мацерацию растительных тканей [4, 5, 7, 15, 16]. Фермент пектатлиаза (EC 4.2.2.2) продуцируется *Erwinia* sp. и накапливается в культуральной среде до концентрации около 100 мг/дигр [4, 5]. Гены пектатлиазы могут быть использованы в качестве удобной модельной системы для изучения механизмов секреции белка во внеклеточное пространство у граматрицательных бактерий. Электрофоретический анализ белков культуральной жидкости после выращивания бактерий штамма ENA49 позволил обнаружить 6 ферментов (изоферментов), характеризующихся пектатлиазной активностью [2]. Это позволяет предположить, что синтез пектатлиаз в клетках штамма ENA49 обусловлен несколькими генами.

Ранее мы осуществили клонирование структурного гена пектатлиазы штамма ENA49 в клетках *E. coli* на фаговом векторе λ 47.1 [1]. BamHI-фрагмент ДНК протяженностью 4 т. п. н., общий для всех PtI-фагов, переклонировали с помощью многокопийной плазмиды pUC19. Гибридные плазмиды pEAN4 и pEAN11, содержащие BamHI-фрагмент в противоположных ориентациях, использовали в качестве радиоактив-