

## ЛИТЕРАТУРА

1. Завацкили М. М. Физико-химические основы мышечной деятельности. 123—125. Тбилиси, 1971.
2. Тикучов Б. А. Биолог. ж. Армении, 39, 3, 193, 1986.
3. Филагоша Я. Г., Штраккфельд И. Г., Есипова И. Г., Мэскалелло И. Е. В сб. Биохимические основы и регуляция процесса мышечного сокращения. 113—119. Ереван, 1972.
4. Леднев В. В. В сб.: Механизмы контроля мышечной деятельности. 121—136, Л. 1985.
5. Komins D. R. Biochemistry, 9, 1702, 1970.
6. Matsunaga T., Noda H. J. Biochem., 56, 67, 1915.
7. Morita F. J. Biochem. M., 313—320, 1971.
8. Snaab M. C., Ptery S. V. Biochem. J., 107, 263—269, 1967.
9. Skriver I. W., Sydes I. D. Biochemistry, 21, 3032—3038, 1982.
10. Szoor A., Konyas L., Zahna S., Konyas L., Kiserleier C. Virobiudomány, 31, 303—307, 1982.
11. Szoor A., Konyas L., Csabos S., Kiserleier C. Virobiudomány, 35, 56—61, 1983.
12. Weber K., Osborn M. Ibid., 24, 4406—4412, 1969.
13. Yasui T., Watanabe S. J. Biol. Chem., 98, 210, 1965.

Поступило 10.IV 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988

УДК 577.21

### ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ В КЛЕТКАХ *E. coli* ПОЛУЧЕННОЙ ПЛАЗМИДЫ pJZA-GH

Г. К. ШАХБАЗЯН, К. Ш. БАБАЯН, И. С. АМБАРЦУМЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван.  
Бурастанская экспериментальная совхоз-лаборатория, АрмССР

Получена рекомбинантная плазмида pJZA-GH, содержащая длинные концевые повторы вируса саркомы Рауса и структурную часть гена гормона роста быка. Анализ РНК, выделенной из *E. coli*, несущей плазмиду pJZA-GH, показал наличие последовательности, гибридизующейся с геном гормона роста быка.

*Ստացվել է ռեկոմբինանտ պլազմիդ pJZA-GH, որը պարունակում է Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի վերջնային երկար կրկնություններ և ցույի անի հորմոնի գենի ստրուկտուրային մասը pJZA-GH պլազմիդ կրող E. coli-ից անջատված ՌՆԹ-ի անալիզը ցույց է տվել ցույի անի հորմոնի գենի հետ հիբրիդիզացվող համարողականությունների առկայությունը:*

A recombinant plasmid pJZA-GH, containing long terminal repeat of Rous sarcoma virus and bovine growth hormone gene sequences is constructed. RNA molecules, isolated from *E. coli* cells, bearing pJZA-GH plasmid, contain sequences homologous to bovine growth hormone gene.

В последние годы интенсивное развитие получила техника микроинъекций генетического материала в зиготы и ранние эмбрионы различных животных [6, 11]. Для проведения подобных исследований предварительно получают серии рекомбинантных плазмид, которые имеют различные регулируемые и нерегулируемые промоторы, а также хорошо охарактеризованные структурные гены.

В качестве промоторов и энхансеров часто используются последовательности длинных концевых повторов ретровирусов. Этот подход особенно популярен еще и потому, что ретровирусы используются как векторы для трансформации клеток эукариот [3].

Цель настоящей работы заключалась в получении рекомбинантных клонов, несущих длинные концевые повторы вируса саркомы Рауса (LTR RSV) [1] и структурную часть гена гормона роста быка [14]. LTR RSV, помимо последовательностей промотора и энхансера [8, 13], несет в себе участки, гомологичные бактериальным промоторам [5, 10]. Показано, что LTR RSV направляет в *E. coli* транскрипцию прилежащих к нему вирусных генов [9]. Кроме того, когда к LTR RSV был подшит бактериальный ген устойчивости к неомицину, то полученные рекомбинантные клоны экспрессировались как в прокариотической, так и в эукариотической системах [10]. Поэтому представлялось интересным прежде чем проводить микроинъекции полученных нами рекомбинантных клонов в зиготы мышей, проверить возможность транскрипции последовательностей гена гормона роста быка в *E. coli*.

**Материал и методика.** Клетки *E. coli* HB 101 выращивали на LB-агаре или жидкой L-среде. Использовали плазмиду рJZA 10 [1] и плазмиду рМА 5, любезно предоставленную Л. Геннигом (ИМГ АН СССР), рестриктивные эндонуклеазы и лигаза—НПО «Фермент», Вильнюс.

Плазмиды выделяли методом щелочной экстракции [4]. Размер и ориентацию вставок ДНК в рекомбинантных плаزمидках определяли электрофорезом в 1%-ном агарозном пластинчатом геле в буфере (мМ): 40— $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 40—Трис  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 1—ЭДТА (рН 7.7). Полученные фрагменты анализировали после окраски бромидом этидия. Фрагменты ДНК нужного размера элицировали на гели методом электроэлициции [2].

Расщепление ДНК соответствующими рестриктазами проводили в буфере, содержащем (мМ): 7 Трис- $\text{HCl}$  (рН 7.5), 7  $\text{MgCl}_2$ , 1 ДТТ и 50  $\text{NaCl}$ , при 37° в течение 1 часа. После инкубации препарат прогревали в течение 10 мин при 65° для инактивации фермента. К расщепленной ДНК добавляли ДНК векторной плазмиды, предварительно линчаризованной и обработанной щелочной фосфатазой. Линчаризацию вели в буфере, содержащем 50 мМ Трис- $\text{HCl}$  (рН 7.5), 100 мМ  $\text{NaCl}$ , 7 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ ДТТ, 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* HB 101 проводили по методу, описанному ранее [1]. Эффективность трансформации определяли по количеству колоний, выросших на чашках с LB-агаром, содержащим 40 мкг/мл ампицилина. Трансформанты тестировали анализом ДНК рекомбинантных плазмид по их подвижности в электрофорезе и расщеплению различными рестриктазами.

Выделение РНК из клеток *E. coli* проводили экстракцией горячим фенолом [2], электрофорез и блоттинг РНК—по методу Томас; гибридизацию фильтров—с  $^{32}\text{P}$  мечеными пробями рВР 322 и фрагментом ДНК, специфичным для гена гормона роста быка; гибридизацию—в 50%-ном формамиде при 42° в течение 48 ч; отмывку—в 0.1

SSC, 0,1 SDS при 42°. После отмывки фильтр экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1.

В отдельных случаях препараты РНК предварительно обрабатывали ДНКазой и РНКазой.

**Результаты и обсуждение.** Плазмида pJZA 10, как видно из рис. 1, представляет собой рВР 322 со встроенным по сайтам Eco RI-Bam HI участком провирусной ДНК RSV, содержащим интактный LTR, не транскрибируемый участок перед геном gag (ген внутренних белков вируса) и фрагмент, кодирующий первые несколько аминокислот гена gag [1]. Эта плазмида использовалась в работе в качестве вектора для подстройки к последовательностям LTR RSV структурной части гена гормона роста быка. Структурную часть гена гормона роста быка вы-

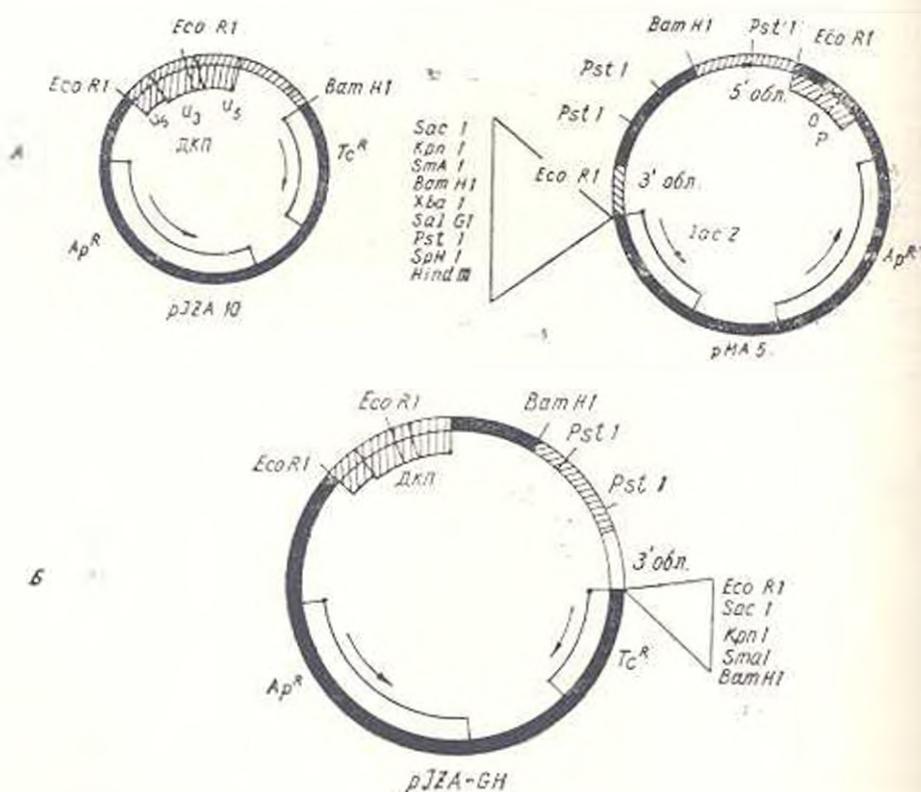


Рис. 1. Схематическое изображение плазмид, использованных в работе: А) структура плазмид pJZA 10 и pMA 5; Б) структура полученной рекомбинантной плазмиды pJZA-GH.

делили из рекомбинантной плазмиды pMA 5, которая представляет собой рекомбинантную плазмиду, несущую в составе вектора рUC 19 по Eco RI сайту участок генома быка, содержащий ген гормона роста. Структурная часть гена гормона роста может быть выделена из состава плазмиды рестрикцией по Bam HI, при этом вырезается фрагмент ДНК длиной 2,15 т. п. н., содержащий структурную часть гена гормона роста быка и 3'-область генома, прилегающего к этому гену. При этом обработка Bam HI удаляет последовательности собственного промотора гена гормона роста [14].

Для получения рекомбинантной плазмиды, которая содержит в себе участок LTR RSV и структурную часть гена гормона роста быка (рис. 1 Б), были проведены следующие процедуры. ДНК рJZA 10 обрабатывали рестриктазой Bam HI. С целью дефосфорилирования 5'-концов молекулы после лиnearизации ДНК обрабатывали щелочной фосфатазой (подобная обработка снижает вероятность самолигирования молекулы). ДНК рМА 5 рестрицировали одновременно Bam HI и Hind III, в результате чего в векторную молекулу встраивается только фрагмент, несущий структурную часть гена гормона роста, содержащий Bam HI концы. После лигирования смеси, содержащей рестрицированные ДНК рJZA 10 и рМА 5, проводили трансформацию клеток *E. coli* HB 101.

Из полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее подвижность при помощи электрофореза. Дальнейшему анализу подвергали те плазмиды, размер которых соответствовал ~ 7 т. п. н. Такие плазмиды рестрицировали Eco RI. В случае получения нужного рекомбинанта при рестрикции Eco RI должны образовываться фрагменты 0,35, 3,0, 4,0 т. п. н. На рис. 2 приведено электрофоретическое разделение фрагментов ДНК плазмид рJZA 10, рМА 5 и № 84, полученных в результате рестрикции Eco RI и Bam HI. Видно, что клон № 84, обозначенный нами как рJZA-GH, представляет собой искомый рекомбинант, несущий последовательности LTR RSV и структурную часть гена гормона роста быка. Рестрикционный анализ показывает также ориентацию гена гормона роста быка в плазмиде рJZA-GH: начало считывания гена гормона роста прилетает к промоторной части LTR RSV.

Ранее было показано, что в составе LTR RSV имеются последовательности, гомологичные промотору бактериальной природы, которые способны направлять транскрипцию прилегающего к ним генетического материала в *E. coli* [5, 10]. Полученные авторами рекомбинантные клоны активно экспрессировались также и в эукариотических клетках. Поэтому нами был проведен предварительный анализ транскрипционной активности клона рJZA-GH в клетках *E. coli* с целью последующего введения методом микроинъекций в зиготы мышей.

На рис. 3 приведены результаты блоттинг-гибридизации РНК, выделенной из клеток *E. coli*, несущих плазмиды рJZA 10, рМА 5 и рJZA-GH с Pst I фрагментом ДНК рМА 5 длиной 1 т. п. н., содержащим только последовательности гена гормона роста быка. Так как при элюции Pst I фрагмента ДНК из геля неизбежно наличие примесей ДНК, несущих плазмидные последовательности, то для дифференциации транскриптов, синтезируемых с последовательностей гена гормона роста, от остальных транскриптов в параллельном эксперименте проводили гибридизацию тех же препаратов РНК с <sup>32</sup>P меченной ДНК рBR 322 (рис. 3 Б).

Анализ синтезируемых транскриптов не выявил в клетках *E. coli*, несущих рJZA 10, последовательностей, гибридирующихся только с Pst I фрагментом гена гормона роста. Все выявляемые полосы гибридизации совпадали с полосами гибридизации с рBR 322. Анализ тран-

криптов, синтезированных в клетках *E. coli*, несущих рМА 5, показал наличие гетерогенной популяции РНК, некоторые из которых гибридизуются только с Pst I фрагментом гена гормона роста. Транскрипты, выявляемые в нижней зоне геля, гибридизуются только с рBR 322. Транскрипция последовательностей гена гормона роста в клетках *E. coli*, несущих рМА 5, связана с наличием в векторной плазмиде рUC 19 последовательностей мощного промотора гена *lac*. Видимо, мы наблюдали появление сквозных транскриптов, инициированных с промотора гена *lac* и доходящих до конца структурной части гена *lac*, встроенного в рUC 19 вектор. При этом образуется транскрипт длиной 5.7 т. п. н. Транскрипты длиной 4 и 2.9 т. п. н., вероятно, образуются в результате неспецифической инициации или терминации транскрипции в участках, прилегающих к структурной части гена гормона роста. В целом уровень транскрипции в клетках *E. coli*, несущих рМА 5, значительно выше, чем в других исследованных клонах. Это обусловлено значительно большей копийностью рекомбинантных плазмид, полученных на основе векторов серии рUC, по сравнению с рBR 322.

При гибридизации РНК из клеток *E. coli*, несущих рекомбинантную плазмиду рJZA-GH, с Pst I фрагментом гена гормона роста, помимо рBR специфических последовательностей выявляются два дополнительных транскрипта длиной 2.9 и 1.9 т. п. н. Транскрипт длиной 2.9 т. п. н. соответствует по длине РНК, которая может синтезироваться при инициации транскрипции с зоной бактериального промотора, локализованной в U<sub>3</sub> области LTR RSV. При гибридизации всех трех препаратов РНК с рBR 322 выявляется гетерогенная, но в целом сходная во всех препаратах популяция РНК размером от 1.6 до 0.5 т. п. н. Полоса 1.6 т. п. н., выявляемая во всех препаратах, соответствует по размеру транскрипту гена *Amp<sup>r</sup>*. Более высокомолекулярные транскрипты 3.3 и 2.4 т. п. н., гибридизующиеся с рBR 322 в клетках *E. coli*, несущих рJZA 10, по всей вероятности, образуются в результате инициации транскрипции с бактериального промотора, локализованного в U<sub>3</sub> области LTR RSV [10].

Не исключено, что в препаратах РНК из *E. coli* могут содержаться примеси ДНК. Для проверки этого предположения в параллельных экспериментах гибридизационному анализу подвергали также препараты РНК, предварительно обработанные РНКазой и ДНКазой. Обработка РНКазой полностью снимала возможность гибридизации с меченым Pst I фрагментом гормона роста и рBR 322. Обработка ДНКазой, несмотря на некоторую деградацию препаратов, связанную с наличием в препаратах ДНКазы примесей РНКазы, практически не изменяла картину гибридизации.

Таким образом, при анализе РНК, выделенной из клеток *E. coli*, несущих плазмиду рJZA-GH, выявляется дискретный транскрипт длиной 2.9 т. п. н., инициируемый с промоторных последовательностей LTR RSV и содержащий последовательности структурного гена гормона роста быка.

На основании приведенных данных можно предположить, что полученная рекомбинантная плаزمида рJZA-GH будет способна нормально-

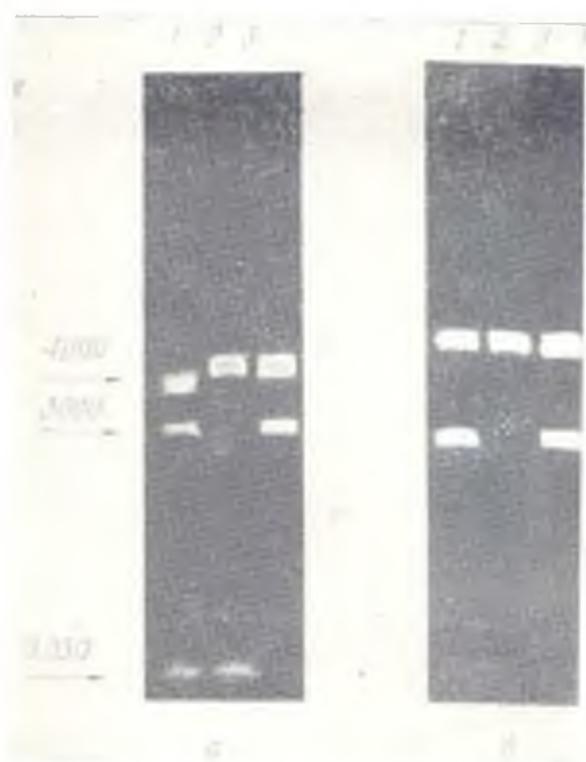


Рис. 2 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК плазмид 1—pJZA-GH1, 2—pJZA 18, 3—pMAA, полученных в результате рестрикции: а—Eco RI и б—Bam HI.

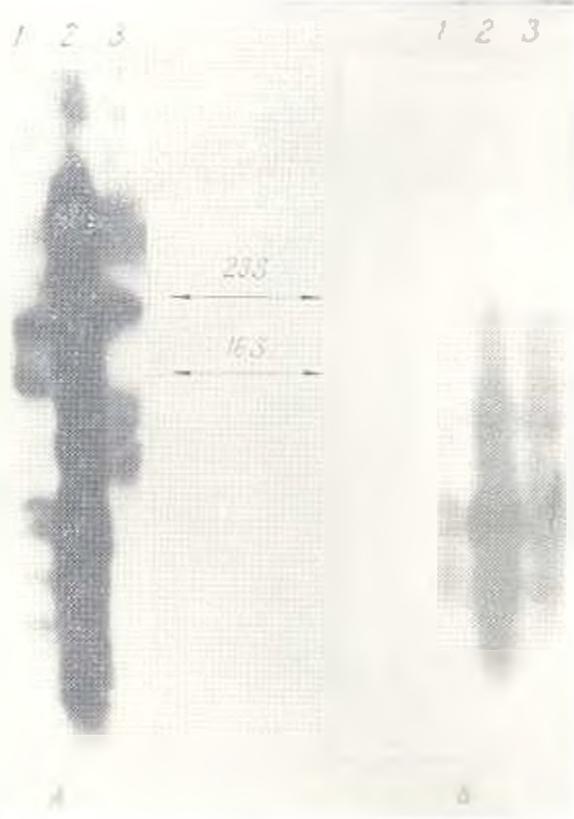


Рис. 3. Блотинг-гибридизация РНК, выделенной из клеток *E. coli*, несущих плазмиды 1 рJZA GH, 2 рМА 5, 3 рJZA 10: А) с PstI фрагментом ДНК рМА 5 длиной 1 + п. н.; Б) с 32P меченой ДНК рВР 322.

транскрибироваться в клетках мышей после микроинъекций се в их зиготы. Это предположение подтверждается также и данными о том, что ген гормона роста при подшивке к нему LTR RSV в состоянии экспрессироваться в культуре клеток после трансфекции [7, 12].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Н. С., Татосян А. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 619—626, 1984.
2. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. В кн.: Молекулярное клонирование, М., 1984.
3. Bernstein A., Berger S., Huszar D., Dick J. Genet. eng., 7, 235—261, 1985.
4. Birnboim U. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 7, 1513—1517, 1979.
5. Guntaka R. V., Mitsialis S. A. Gene, 12, 113—121, 1980.
6. Hammer R. E. Nature, 315, 680—683, 1985.
7. Kopechick J. J., Malavarea R. H., Livelli T. J., Leung F. C. DNA, 4, 23—33, 1985.
8. Luciw P. A., Bishop J. M., Varmus H. E., Capocchi M. R. Cell, 33, 705—716, 1983.
9. Mermer B., Malamy M., Coffin J. M. Molec. cell. Biol., 3, 1749—1758, 1983.
10. Mitsialis S. A., Yong J. F., Pelese F., Guntaka R. V. Gene, 16, 217—225, 1981.
11. Palmiter R. P., Brinster R. L. Cell, 41, 343—345, 1985.
12. Pastan F., Tocci M. J., Leung F., Kopechick J. J. Gene, 38, 227—232, 1985.
13. Weber F., Schaffner W. EMBO J., 4, 949—956, 1985.
14. Woychik R. P., Camper S. A., Lyons R. H., Horowitz S., Goodwin E. C., Roitman F. M. Nucl. Acids Res., 10, 7197—7210, 1982.

Поступило 29.XII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988

УДК 577.352.315+23

### ВЕЛИЧИНА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ И РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН КЛЕТОК

К. А. БАГРАМЯН, Э. А. КАРАГУЛЯН, А. А. ТРЧУНЯН, Г. Г. САРКИСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Предполагается, что образование отрицательных значений ОВП в процессе роста бактериальной суспензии определяет готовность клеток к жизнедеятельности. Показано, что изменения ОВП этой суспензии обусловлены процессами, происходящими непосредственно на поверхности бактериальной мембраны, тогда как в окружающей среде эти изменения не наблюдаются.

Ենթադրվում է, որ բակտերիալ սուսպենզիայի աճման ընթացքում ՕՎՊ-ի բացասական արժեքների առաջացումը որոշվում է բջջային մեմբրանի ուղղորդվածակողմ, քիմիկալիանդակված գիճակը, Տեսարար է, որոշում է բջջային պատրաստու-

Сокращения: ОВП,  $E_h$ —окислительно-восстановительный потенциал.