

## ПЕРЕНОС БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА *sacC* В КЛЕТКИ ТАБАКА И ТОПИНАМБУРА

А. Н. АРЗУМАНЯН\*, П. К. ПЕТРОСЯН\*, Р. Л. ГЕВОРКЯН\*\*, Ю. Г. ЦОПОВ\*\*

\*НИИНА, \*\*Ереванский государственный университет,  
кафедра физиологии и анатомии растений

*Ген леваназы—трансформация растительных клеток—топинамбур.*

Развитие методов генной инженерии, позволяющих осуществлять клонирование бактериальных генов в растительных клетках, открывает большие возможности для конструирования высших растений, обладающих новыми признаками. Удобным инструментом для работ по трансформации высших растений являются Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, способные интегрироваться в хромосому растительного хозяина [3].

Нашей целью было клонирование гена леваназы *sacC* из *Bacillus subtilis* [4] в некоторых линиях табака *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glumabaginigifolia* и топинамбура *Helianthus tuberosus*. Леваназа обладает фруктофуранозидазной активностью и способна гидролизовать сахарозу и инулин, запасной полисахарид топинамбура [5]. Получение трансгенных растений табака и топинамбура, несущих ген леваназы, позволит подойти к разработке способов воздействия на углеводный обмен высших растений, в частности, на содержание в растениях моносахаров и синтез запасных полисахаридов, что представляет большой практический интерес. Предлагаемая работа представляет новый подход для решения этих задач, может способствовать разработке практических методов манипулирования углеводным обменом у высших растений.

**Материал и методика.** Клонирование гена *sacC* и другие работы с ДНК проводили по общепринятым методикам [2]. Трансформацию табака и топинамбура осуществляли методом «листовых дисков» [1]. Для табака применяли также метод прямого переноса плазмидной ДНК в протопласты [1]. В качестве объектов использовали аseptически поддерживаемые линии *N. tabacum* SR1, *N. glumabaginigifolia* и линию *H. tuberosus*, введенную нами в культуру путем проращивания клубней *in vitro*.

**Результаты и обсуждение.** Для переноса гена леваназы в *A. tumefaciens* была использована плаزمида рАР2034, содержащая изолированный из T-ДНК дуальный промоторный фрагмент (1'—2') величиной 179 пар оснований [8]. Один из разнонаправленных промоторов этого фрагмента (2') в растительных и бактериальных клетках определяет транскрипцию бактериального гена неомицинофосфотрансферазы (NPT II), кодирующего устойчивость к канамицину и используемого благодаря этому в качестве маркера для отбора трансформантов. Сразу же вслед за другим промотором (1') находятся уникальные сайты SalI и BamHI, пригодные для клонирования генов.

Структурная часть гена леваназы *sacC* с последовательностью, содержащей собственный участок связывания рибосом, но не содержащей собственного леваназного промотора [5], была предварительно переклонирована в плазмиду *pUC7* [7] с тем, чтобы указанная последовательность оказалась между сайтами *Bam*III и *Sal*I полилинкера *pUC7*. Этот предварительный этап позволил на следующей стадии легко переклонировать ген *sacC* величиной 2,4 тысяч пар оснований из *pUC7* уже на *pAP2034* по сайтам *Bam*III и *Sal*I в необходимой и единственно возможной ориентации.

Получена в результате конструкция, в которой структурная часть гена *sacC* находится под управлением растительного промотора  $\Gamma$  и терминирующих сигналов.

Генетическая карта этой плазмиды подтверждается ее рестрикционным анализом.

Полученная конструкция была затем перенесена в клетки *A. tumefaciens*, содержащие акцепторный вектор *pGV3850*, с образованием плазмидных кониугатов за счет гомологичной рекомбинации. Поскольку у вектора *pAP2034* отсутствуют нужные  $\Gamma$ -гены конъюгации, генетический перенос обеспечивается в триродительском скрещивании по транс-схеме, мобилизуемой плазмидой *pRK2013*, имеющей собственный *topA*-сайт и совместимой с *pBR322* [1]. В качестве донорных штаммов выступает *E. coli* штамм HB101 с конструкцией и с *pRK2013*.

Отбор конъюгатов *A. tumefaciens* вели на селективной среде, содержащей стрептомицин (селекция против реципиента), карбенициллин и рифамицин (селекция против донора).

Эксперименты по трансформации растений проводили методом «листовых дисков». Эксплантаты обрабатывали средой, содержащей *A. tumefaciens*, затем переносили на среды для регенерации табака и каллюсогенеза топшамбура [1]. Проводили также эксперименты по прямому переносу конструкции с леваназным геном в пролиферативной области табака, обработанные полиэтиленгликолем.

В настоящее время работа находится на стадии отбора трансформированных клонов на соответствующих селективных средах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гловар Л. Клонирование ДНК. Методы. М., 1988.
2. Маннинг Т., Фрэнк Э., Сэмбрик Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М., 1984.
3. Ниррели Э. С., Андрианов В. М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.
4. Frihs K. and et. al. Biotechnology, 3, 333-341, 1986.
5. Martin S. and et. al. Mol. Gen. Genet., 208, 177-184, 1987.
6. Martin-Verstraete I. and et. al. J. Mol. Biology, 214, 657-671, 1989.
7. Vieira G. and Messing G. Gene, 19, 259-269, 1982.
8. Vellem J. and Seboll J. Nucl. Acids. Res., 19, 6961-6997, 1985.

Поступило 14.11.1991 г.