

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

БИООРГАНИЧЕСКАЯ  
ХИМИЯ

ТОМ 13\*1987

ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК





УДК 577.21

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДОВ  
NOS-NPT — МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ****Смирнов О. Ю., Таишулатов А. Ш., Захарьев В. М.,  
Скрябин К. Г.***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Разработанные в последнее время методы переноса генов в высшие растения дали исследователю мощный инструмент для выяснения закономерностей, лежащих в основе таких фундаментальных процессов передачи генетической информации, как транскрипция и трансляция. Знание механизмов, контролирующих экспрессию генов, позволит в будущем создавать совершенные, высокоэффективные системы экспрессии гетерологичных генов, кодирующих определенные целевые белки.

В отличие от прокариот до настоящего времени процессы транскрипции и трансляции у эукариот, в частности у растений, на молекулярном уровне остаются еще во многом не выясненными. Удалось проанализировать роль ТАТА- и СААТ-элементов растительных промоторов в экспрессии генов *in vivo* [1–3], имеются данные о том, что район мРНК, непосредственно окружающий стартовый AUG-кодон, является критическим при образовании инициационного комплекса [4–6], однако все еще нет четкого представления о структурной организации 5'-нетранслируемой последовательности мРНК и ее функции при инициации трансляции.

Целью настоящей работы явилось создание генно-инженерных конструкций, содержащих различные нуклеотидные последовательности в области инициации трансляции. В качестве компонентов этих конструкций были выбраны промотор хорошо изученного гена нопалинсинтетазы NOS из Т-ДНК (фрагмент плазмиды, переносимый в геном растения при трансформации) плазмиды рTiC58 *Agrobacterium tumefaciens* [7], конститутивно работающего в растениях, а также ген неомицинофосфотрансферазы NPTII из Tn5, экспрессию которого легко можно определить как *in vivo*, по устойчивости клеток к канамицину, так и *in vitro*.

Нами был получен набор плазмид, несущих делеции в 5'-нетранслируемой области гена NOS (рис. 1а). У полученной серии делеционных вариантов гена, лишенных кодирующего района, была определена первичная структура (рис. 1б).

В плазмиды, несущие различные варианты 5'-концевой области гена NOS, клонировали по *Bam*HI-*Eco*RI-сайтам фрагмент этого же гена, содержащий участки полиаденилирования мРНК. Полученные векторы экспрессии в растениях серии рOS имеют структуру «промотор-*Bam*HI-терминатор», что позволяет помещать под контроль этих регуляторных участков нужные гены.

Затем в эти плазмиды по *Bam*HI-сайту были клонированы несколько различающиеся по длине фрагменты ДНК, содержащие структурную часть гена NPT. Нуклеотидные последовательности мест соединения промотора NOS и гена NPT в полученных гибридных генах NOS-NPT представлены на рис. 2а.

В плазмиде рOS26Neo единственным иницирующим кодоном является ATG гена NOS, а в остальных конструкциях – ATG гена NPT. Бактериальный ген NPT содержит перед иницирующим кодоном дополнительный ATG-кодон, не попадающий в рамку считывания. Этот «ложный» ATG-кодон индуцирует синтез пептида из 7 аминокислот и, таким

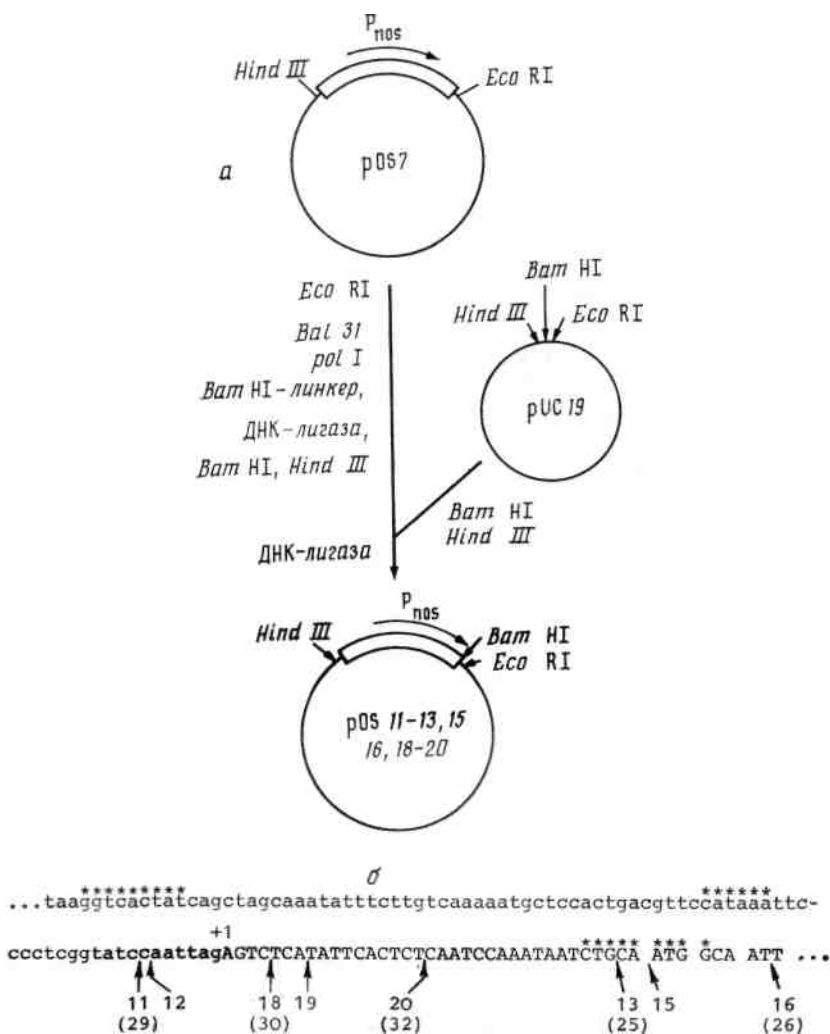


Рис. 1. Конструирование плазмид, содержащих делеции в 5'-концевой части гена нопалинсинтазы. *a* – схема получения делеций в плазмиде pOS7, содержащей промотор и начало структурной области гена NOS. Сайты расщепления рестриктазами показаны стрелками.  $P_{nos}$  – промотор гена NOS, стрелкой указана его ориентация; *б* – делеции в 5'-районе гена нопалинсинтазы. Транскрибируемая последовательность изображена заглавными буквами, транслируемые кодоны – вразрядку. Стрелками обозначены левые границы делеций, цифрами – номера соответствующих плазмид серии pOS, содержащих такой «укороченный» промотор. Ниже в скобках указаны номера плазмид, содержащих данный промотор и терминатор гена NOS. Звездочками выделены нуклеотиды, необходимые для инициации транскрипции и трансляции

образом, затрудняет правильную инициацию трансляции. В плаزمидах pOS25Neod, pOS32Neod и pOS30Neod этот ATG-кодон удален.

Интересно, что «ложный» AUG-триплет мРНК должен быть в силу фланкирующих нуклеотидов (ACAGGAUGA) более предпочтителен, чем иницирующий кодон (UUCGCAUGA) (консенсусная последовательность – CC(A/G)CCAUGG [5]). Действительно, как показано в работах [8–10], вектор Bin19 [10] по сравнению с pLGV23Neo [9] (рис. 2б) повышает устойчивость клеток табака к канамицину в 2–3 раза, в то время как вектор pGA471 [8], где трансляция начинается с более «удобного» AUG-кодона гена NOS (CUGCAUGG), – еще в 1,5 раза. Однако ген NOS-NPT плазмиды pMON177, аналогичный Bin19, экспрессируется в клетках петунии в 5–6 раз сильнее, чем ген pMON129 [11]. Такое различие в результатах, по-видимому, не связано с использованием другого растительного

a

pOS26Neo...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCA ATG GCA ATC CGG ATC CGG GGA TTG ...

pOS25Neo...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATG ATT ...

pOS25Neod...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCCGGATCCGGCGC ATG ATT GAA ...

pOS32Neo...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATG ATT GAA ...

pOS32Neod...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCCGGATCCGGCGC ATG ATT GAA ...

pOS30Neo...TATCCAATTAGAGTCCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATG ATT GAA ...

pOS30Neod...TATCCAATTAGAGTCCCGGATCCGGCGC ATG ATT GAA ...

pOS29Neo...TATCCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATG ATT GAA ...

б

pGA471.....TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCA ATG GCA ATT ACC TTA TCC GCA ACT TCT TTA CCT  
ATT TCC GCC cgg atc cgg GCA GGT ...

pMON129...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATG ATT...

pLGV23Neo...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATCTGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATG ATT...

pMON177...TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCAGATCCTAGACGATCGTTTCGC ATG ATT GAA ...

Bin19.....TATCCAATTAGAGTCTCATATTTCACTCTCAATCCAAATAATctgcaggatctgggatcgtttcgc ATG ATT GAA ...

Рис. 2. *a* – нуклеотидные последовательности гибридных генов NOS-NPT в районе ATG-кодона в полученных плаزمиды серии pOS...Neo и pOS...Neod; *б* – структура генов NOS-NPT в районе ATG-кодона в плаزمиды pGA471 [8], pLGV23Neo [9], Bin19 [10], pMON129 и pMON177 [11]. Последовательность гена NOS, сохранившаяся после обработки нуклеазой *Bal31*, подчеркнута; транслируемые кодоны даны вразрядку. Подчеркнуты иницирующий и «ложный» ATG-кодоны. Мелким шрифтом даны последовательности, выведенные из схем опытов (без прямого определения первичной структуры)

объекта. Наконец, в этих векторах разница в расстоянии от AUG-кодона до 5'-конца мРНК составляет от 12 до 35 нуклеотидов (рис. 26), что может, если исходить из модифицированной «сканирующей модели» инициации трансляции [4], влиять на эффективность трансляции.

Полученные нами плазмиды дадут возможность оценить *in vivo* эффект как расстояния от AUG-кодона до 5'-конца мРНК (pOS29Neo – pOS30Neo – pOS32Neo – pOS25Neo; pOS30Neo – pOS32Neo – pOS25Neo), так и нуклеотидного окружения AUG-кодона (pOS26Neo – pOS32Neo), а также влияние дополнительного ложного AUG-триплета (pOS26Neo – pOS30Neo – pOS32Neo – pOS29Neo) при условии равноудаленности AUG-кодона от 5'-конца мРНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Shaw C. H., Carter G. H., Watson M. D., Shaw C. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 20. P. 7831–7846.
2. Odell J. T., Nagy F., Chua N.-H. // Nature. 1985. V. 313. № 6005. P. 810–812.
3. Morelli G., Nagy F., Fraley R. T., Rogers S. G., Chua N.-H. // Nature. 1985. V. 315. № 6016. P. 200–204.
4. Kozak M. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 20. P. 5233–5252.
5. Kozak M. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 2. P. 857–872.
6. Sargan D. R., Gregory S. P., Butterworth P. H. W. // FEBS Lett. 1982. V. 147. № 2. P. 133–136.
7. Dipecker A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P., Goodman H. M. // J. Mol. Appl. Genet. 1982. V. 1. № 6. P. 561–573.
8. An G., Watson B. D., Stachel S., Gordon M. P., Nester E. W. // EMBO J. 1985. V. 4. № 2. P. 277–284.
9. Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M., Schell J. // EMBO J. 1983. V. 2. № 6. P. 987–995.
10. Bevan M. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 22. P. 8711–8721.
11. Rogers S. G., Fraley R. T., Horsch R. B., Levine A. D., Flick J. S., Brand L. A., Fink C. L., Mozer T., O'Connell K., Sanders P. R. // Plant Mol. Biol. Reporter. 1985. V. 3. № 3. P. 111–116.

Поступило в редакцию  
19.XII.1986

#### CONSTRUCTION OF CHIMAERIC MARKER GENES NOS-NPT FOR PLANTS

**SMIRNOV O. Yu., TASHPULATOV A. S., ZAKHARYEV V. M.,  
SKRYABIN K. G.**

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A series of downstream deletions in the 5'-untranslated region of the nopaline synthase gene have been obtained after digestion with *Bal31* nuclease. These deletion mutants may be used to determine sequences required for the efficient translation. Plasmids for gene expression in plants were obtained. Fused genes NOS-NPT, containing different nucleotides upstream of the ATG codon and/or different lengths between the ATG codon and the 5'-end of mRNA, were constructed. Some of these genes contain an additional ATG out of reading frame.