



УДК 577.21

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДОВ  
NOS-NPT — МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ РАСТЕНИЙСмирнов О. Ю., Ташиулатов 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 неомизинфосфотрансферазы 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 полнаденилрования 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

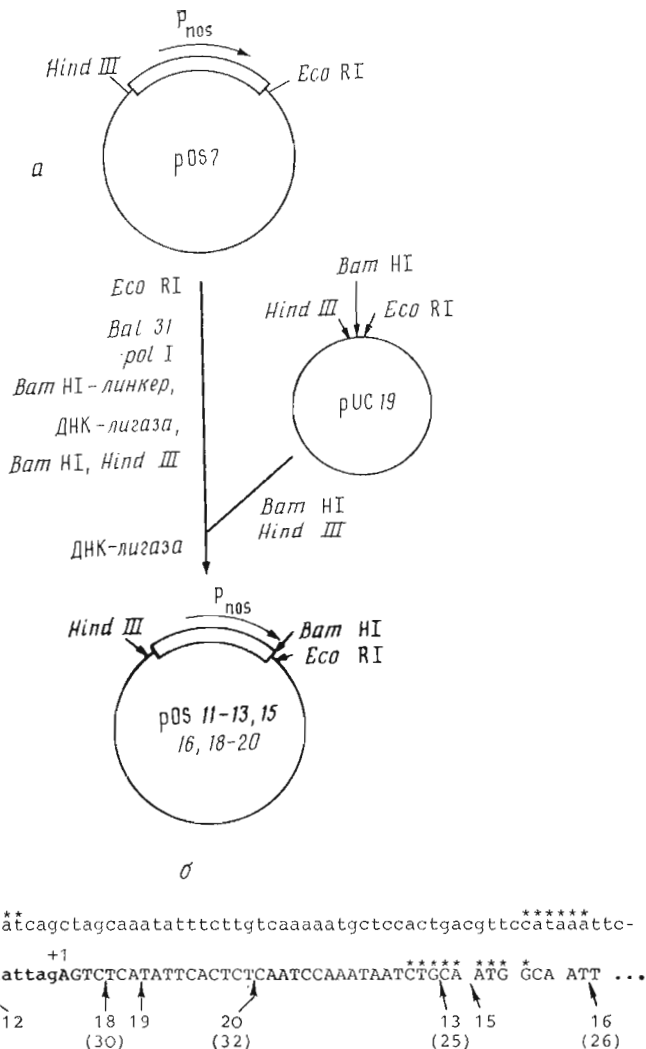


Рис. 1. Конструирование плазмид, содержащих делеции в 5'-концевой части гена полипептидазы. *a* — схема получения делеций в плазмиде pOS7, содержащей промотор и начало структурной области гена NOS. Сайты расщепления рестриктазами показаны стрелками. P<sub>nos</sub> — промотор гена NOS, стрелкой указана его ориентация; *б* — делеции в 5'-районе гена полипептидазы. 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 плаزمидях 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 —  $\text{CC}_G^* \text{CCAUGG}^*$  [5]). Действительно, как показано в работах [8–10], вектор Bin19 [10] по сравнению с pLGV23Neo [9] (рис. 2*б*) 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 дру-

POS26Neo...TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCA ATG GCA ATC CGG ATC CGG GGA TTG ...  
 POS25Neo...TATCCAAATTAGAGTGTCTAATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATCAGGATCGTTTCCG ATG ATT ...  
 POS25Neo...TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...  
 POS32Neo...TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...  
 POS32Neo...TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...  
 POS30Neo...TATCCAAATTAGAGTCTCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...  
 POS30Neo...TATCCAAATTAGAGTCTCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...  
 POS29Neo...TATCCCGGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...

PGA471.....TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCA ATG GCA ATT ACC TTA TCC GCA ACT TCT TTA CCT  
ATT TCC GCC cgg atc cgg GCA GGT ...  
 rMON129.....TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCAGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT...  
 rLGV23Neo...TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT ...  
 rMON177.....TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCAGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...  
 Bin19.....TATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCAGATCTGATCAAGAGACAGGATCGTTTCCG ATG ATT GAA ...

Рис. 2. *a* – нуклеотидные последовательности гибридных генов NOS-NPT<sup>1</sup> в районе ATG-кодона в полученных плаزمидлах серии рOS...Neo и рOS...Neo; *b* – структура генов NOS-NPT в районе ATC-кодона в плазмидлах рСА471 [8], рLGV23Neo [9], Bin19 [10], рMON129 и рMON177 [11]. Последовательность гена NOS, сохранившаяся после обработки нуклеазой Bal31, подчеркнута; транскрибируемые кодоны даны вразрядку. Подчеркнуты иницирующие и «ложный» ATG-кодоны. Мелким шрифтом даны последовательности, выведенные из схем опытов (без прямого определения первичной структуры)

того растительного объекта. Наконец, в этих векторах разница в расстоянии от AUG-кодона до 5'-конца мРНК составляет от 12 до 35 нуклеотидов (рис. 2б), 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; pOS30Neod — pOS32Neod — pOS25Neod), так и нуклеотидного окружения AUG-кодона (pOS26Neo — pOS32Neod), а также влияние дополнительного ложного AUG-триплета (pOS26Neo — pOS30Neo — pOS32Neod — 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. Sargun 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.