



УДК 577.214.6+581.192.7

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ГОРМОНА – ЖАСМОНАТА.

I. БЕЛКИ – РЕГУЛЯТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА *p. pinII* КАРТОФЕЛЯ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ЖАСМОНАТОМ

© 1996 г. А. И. Гуревич[#], Т. П. Тузова, Е. Д. Шпак, Н. Н. Старкова,
Р. С. Есипов, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 25.04.95 г.

Из ДНК картофеля методом ПЦР выделен фрагмент, содержащий регуляторный участок гена *p. pinII*. Этот участок ДНК определяет активацию транскрипции гена в присутствии жасмоната. Выделенный фрагмент ДНК клонирован в плазмиде рТЕ2рб. На основе этой плазмиды получен аффинный сорбент, с помощью которого из суммы картофельных белков выделены и охарактеризованы 4 белка, способных десорбироваться с аффинного сорбента в присутствии физиологической концентрации жасмоната. Вероятно, эти белки являются субъединицами двух белков-репрессоров транскрипции, для которых жасмонат служит индуктором. В связывании белков-репрессоров с регуляторным участком гена принимают участие три сайта (боксы G, I и III), подобие которых можно проследить при анализе структур различных растительных генов, регулируемых жасмонатом.

Ключевые слова: жасмоновая кислота, гормональная регуляция, регуляторные участки, транскрипция, белок-репрессор.

Целью настоящей работы было найти подходы к изучению молекулярного механизма регуляции жасмонатом биосинтеза в растительной клетке. Известно, что гормональная регуляция биосинтетических процессов в растительной клетке жасмонатом (жасмоновой кислотой, JA, или метилжасмонатом, MJ) происходит на двух уровнях – транскрипции и трансляции (см. обзор [1]).

Регуляция транскрипции выражается в активации некоторых генов в присутствии жасмоната и образовании значительных количеств соответствующих мРНК [2, 3]. Примерами таких генов являются гены ингибиторов протеиназ картофеля (*Solanum tuberosum*, гены *p. pinI* [4] и *p. pinII* [5]) и томатов (*Lycopersicon esculentum*, ген *t. pinI* [6]), липоксигеназы соевых бобов (*Glycine max*, ген *lox-3* [7]), соевых вегетативных белков сохранения (*G. max*, гены *vspA* [8] и *vspB* [9]), фенилаланин-аммоний-лиазы из *Rhodotorula rubra* (ген *pal* [10]), халконсинтазы петрушки (*Petroselinium sativum*, ген *chs* [11]), нопалинсинтазы из опухолевых тканей растений (*Agrobacterium rhizogenes*, ген *nos* [12, 13]).

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, JA – жасмоновая кислота, MJ – метилжасмонат. Префикс “d” в формулах полидезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки.

Было установлено, что делеции в промоторной области изученных генов ведут к утрате ими способности активироваться в присутствии жасмоната. Этим путем были обнаружены участки, ответственные за взаимодействие с жасмонатом, и установлено их строение. В случае гена *p. pinII* было показано, что участок взаимодействия расположен в области –500 ... –620 по отношению к старту транскрипции и совпадает с энхансером [13]. Такие участки были обнаружены в гене *vspA* в области –1170 ... –1270 [14], в гене *vspB* – в области –480 ... –580 [14], в гене *chs* – в области –120 ... –170.

Размеры участков, отвечающих за взаимодействие с жасмонатом, делают невероятным предположение о прямом взаимодействии гормона с ДНК. Скорее всего, активация транскрипции включает в себя взаимодействие с белком (активатором или репрессором), способным к образованию комплекса с жасмонатом, являющимся, таким образом, индуктором.

Проведенный ранее сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей центральной части регуляторных участков показал, что в генах *vspA* и *vspB*, а также *p. pinII* и *chs* в центральной части расположен так называемый G-бокс, включающий в себя гексануклеотид CACGTG [14].

А

5' - CAGATAATTCATGAATATTTTATCCTC
 5' - CAGATAATTCATGAATATTTTATCCTCTTCCGTGTGCAATAATAGAGT
 GTCTATTAAGTACTTATAAAAAATAGGAGAAAGGCACACGTTATTATCTCA

 TCCAACTTAATTATCACGTGGACTTATAAGAAACCGATGCTGGATGATAA
 AGGTTGAATTAATAGTGCACCTGAATATTCTTTGGCTACGACCTACTATT

 TTATTTAAAAAACAAGCAAGTCGGGGTCAGTACAGCTTGCTGAATAGGAG - 3'
 AATAAATTTTTTTGTTCGTTTCAGCCCCAGTCATGTTCGAACGACTTATCCTC
 CCCCAGTCATGTTCGAACGACTTATCCTC - 5'

В

Рис. 1. Структура амплифицированного участка картофельной ДНК и праймеров А и В для амплификации и секвенирования.

Структура G-боксов была обнаружена в промоторных областях многих дрожжевых и растительных генов, регулируемых не только жасмонатом, но и другими факторами, активирующими транскрипцию (действие абсцизовой кислоты или ауксина, поранение или другие стрессовые условия) [11, 15], а также в ряде генов бактерий, вирусов и млекопитающих. Кроме того, было установлено, что с последовательностью G-боксов способен связываться фактор активации транскрипции GBF1 из *Arabidopsis thaliana* [16]. Участок ДНК пшеницы, содержащий G-боксы и ответственный за активацию транскрипции абсцизовой кислотой, оказался способным связываться с 18-кДа регуляторным белком (leucine-zipper protein), структура которого была установлена [17].

В то же время было установлено, что транскрипция гена *nos* из *Agrobacterium rhizogenes* также регулируется жасмонатом и участок гена, непосредственно отвечающий за связывание гормона и за действие других активаторов транскрипции (поранение, ауксины), находится в предпромоторном участке -131 ... -112, включающем в себя структуру GCACAT(G)ACGT, которую можно рассматривать как потенциально имеющую Z-форму ДНК (Z-элемент) [18, 19]. Подобные Z-элементы, имеющие консенсусную структуру GCANNAT-CRCRY, содержатся в предпромоторной области (-70 ... -300) ряда других, индуцируемых ауксином генов [19].

С другой стороны, в упомянутых выше генах *vspA*, *vspB*, *p. pinII* и *chs* на расстоянии 10 - 50 п. о. от G-боксов находятся другие в какой-то мере гомологичные последовательности (боксы I и III) [14]. Размеры гомологичных боксов (в пределах витка спирали ДНК) и большое расстояние между ними дает основание предположить, что регуляторными участками может взаимодействовать

не один, а несколько белков-регуляторов, образующих, возможно, сложный комплекс, взаимодействующий с жасмонатом.

С целью идентифицировать белки, участвующие во взаимодействии с жасмонатом, мы выделили участок ДНК картофеля, соответствующий району энхансера транскрипции гена *p. pinII* длиной 150 п. о. и содержащий структуры боксов G, I и III (рис. 1). Этот фрагмент был получен в результате ПЦР с праймерами А и В и затем клонирован по *EcoRV*-сайту плазмиды рТЕ2 [20]. В результате была получена плазида рТЕ2rb, структура которой была подтверждена секвенированием по Сэнгеру.

На основе плазмиды рТЕ2rb мы приготовили аффинный сорбент путем включения ее в 4% гель легкоплавкой агарозы. Из молодых листьев картофеля мы выделили сумму белков и предварительно освободили от связанных фрагментов картофельной ДНК с помощью DEAE-сорбента. К раствору этого суммарного белка в буфере с малой ионной силой была добавлена фрагментированная тимусная ДНК для предотвращения неспецифической сорбции картофельных белков на аффинном сорбенте (ср. работу [21]). Затем суммарный белок мы пропустили через аффинный сорбент, который затем промыли тем же буфером с малой ионной силой. В элюате (см. рис. 2, фракция 1) содержались белки, не связанные с аффинным сорбентом. Эта фракция практически не отличалась по составу от исходного суммарного белка. Затем аффинный сорбент промыли буфером с малой ионной силой (элюат не содержал заметных количеств белка) и, наконец, тем же буфером, но содержащим 4 мкМ метилжасмонат. В элюате было обнаружено 4 белка (α - 15.0, β - 16.5, γ - 58, δ - 70 кДа) (рис. 2, фракция 2). Судя по результатам сканирования геля после

электрофореза, интенсивность полосы α была вдвое ниже интенсивности полос γ и δ , что при вчетверо меньшей его молекулярной массе указывает на вдвое более высокую молярную концентрацию белка α . Интенсивность полосы β была вдвое выше, чем полосы α , что при примерном равенстве их молекулярных масс указывает на вдвое более высокую молярную концентрацию β . На этом основании можно сделать вывод, что молярное соотношение белков α , β , γ , δ в элюате составляет 2 : 4 : 1 : 1. При электрофокусировании эти белки образуют в геле 4 полосы (рис. 3), и, в соответствии с их относительной интенсивностью, можно считать, что десорбированные белки характеризуются следующими rI : α – 4.0, β – 6.65, $\gamma + \delta$ – 4.25 + 4.50.

Полную десорбцию оставшихся в колонке после промывки раствором жасмоната белков проводили 0.5% раствором SDS (рис. 2, фракция 3). В этой фракции наряду с незначительным количеством неспецифически сорбированных белков содержались те же белки, что и во фракции 2.

Наконец, при пропускании через аффинный сорбент раствора суммарного белка, содержащего 4 мкМ метилжасмонат, оказалось, что в этих условиях белок β теряет сродство к сорбенту и сорбируются только белки α , γ и δ в молярном соотношении 2 : 1 : 1 (рис. 2, фракция 4).

Таким образом, представляется вероятным, что с выделенным из ДНК картофеля энхансерным участком связываются два белка, содержащие, по-видимому, по 4 субъединицы ($\alpha_2\gamma\delta$ и β_4). Мы предполагаем, что эти белки образуют единый комплекс с ДНК. При воздействии метилжасмоната на этот комплекс последний диссоциирует, и, следовательно, связывающиеся с энхансерным участком белки являются репрессорами, а вызывающий диссоциацию жасмонат представляет собой индуктор транскрипции. Диссоциация комплекса с ДНК – обратимый процесс, и, возможно, различное сродство к энхансерному участку – причина того, что в присутствии малой концентрации индуктора только белок $\alpha_2\gamma\delta$, но не β_4 связывается с аффинным сорбентом. Вероятно, во взаимодействии с репрессорами принимают участие все три сайта связывания (боксы G, I и II).

Следует отметить, что при анализе нуклеотидных последовательностей промоторных областей растительных генов, способных к активации транскрипции в присутствии жасмоната, мы нашли (рис. 4), что все гены содержат в центре выделенных участков гомологичную последовательность G-бокса с немногочисленными заменами. Как уже отмечалось ранее, последовательность в G-боксе способна образовать левостороннюю спираль Z-формы ДНК [22, 23]. Другие гомологичные последовательности, слева и справа от

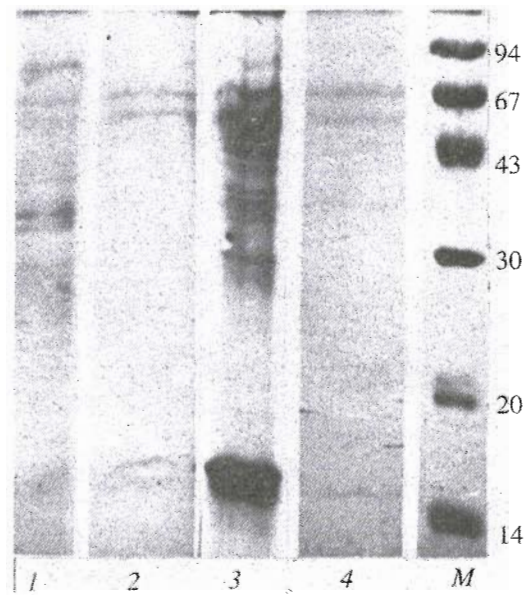


Рис. 2. Электрофорез в 15% ПААГ фракций белков картофеля, разделенных с помощью аффинного сорбента и метилжасмоната. Указаны номера фракций (1 - 4) и стандарты молекулярных масс (M, кДа). Условия приведены в "Экспер. части".



Рис. 3. Электрофокусирование фракции белков, десорбирующихся в присутствии MJ с аффинного сорбента. 6% ПААГ с формальдами (рН 3.0 - 9.5). Приведены rI белков-стандартов.

	[Ia]	[Ib]
<i>p. pinII</i>	GATAATTCATGAATATTTTAT- [CCTCTTTCC] -GTGTGCAA-----	
<i>lox-3</i>	TTATTGATTTTATCTGGTTTG- [GTTCTTTGC] -A-----	
<i>pal</i>	-----CTCGGACGTT- [CCGAACGTC] -GTCTTGCC- [GCCGCCGCGT] -TG	
<i>t. pinI</i>	----ATTCATAATATAGAGATTAATGGTAGTAATATGTGTCCT- [CCACACACAT] ---	
<i>p. pinI</i>	--- TAATATACCGATTAGTGGTATTAGTGTATATGATGTGTC- [CCCCACAAAC] ---	
<i>nos</i>	--- TCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAAGTCGCCTAAGGT- [CACTATCAGC] -TA	
<i>vspA</i>	----- [CCATACAAC] ---	
<i>vspB</i>	----- [CCCTAGAACC] ---	
<i>chs</i>	-----AAATCCCCACCATGGTTGCAAGTAGCAGTTACAT- [CCACATAACT] -CC	
	[G]	
<i>p. pinII</i>	-----TAATAGAGTTCCAACCTAATT- [ATCACGTGGA] -CTTATAAGAAACCGAT	
<i>lox-3</i>	----- [TGCACGTATA] -TGACA-----	
<i>pal</i>	-----CGTCCGCCGTCGACTTTG- [TCCTCGTGTG] -CTCACGCCTCCTTCTT	
<i>t. pinI</i>	----- [TACACGTCCA] -TTCAATTTTCATTGTC	
<i>p. pinI</i>	----- [TACAGGTGAA] -TTAAATTTTCATTGTC	
<i>nos</i>	GCAAATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCA- [CTGACGTTC] -A-----	
<i>vspA</i>	----- (N) 28----- [ATCACGTGCA] -----	
<i>vspB</i>	----- (N) 26----- [TACACGTGCA] -----	
<i>chs</i>	----- TCCCTTAT- [TCCACGTGGC] -CATCCGGTGGCCGTCC	
	[IIIb]	[IIIa]
<i>p. pinII</i>	[GCTGGATGATAATT] -ATTTAAAAAACAAGCAAG- [TCGGGGTCAGTACAG] -CTTG	
<i>lox-3</i>	-----GTTTGGTTTGCACA- [TTGGAGTCTGAGTCC] -GCTA	
<i>pal</i>	[TCTCTCTTCTGCTTTCC] -TCACTT---CACTCTG- [CAAGTCCCGCCTCGCA] -TCC	
<i>t. pinI</i>	[CCTCTCACTTCTCGTAT] -ATCAAAACATGATATTTTTTTTTCSTTTATCTTTCATCAAC	
<i>p. pinI</i>	[CCTCCTCACTTCTCGTA] -TGTAATTA AAAATATATCAAAACATAATCATTTTAATTG	
<i>nos</i>	----- [TAAATTCCCCTCGGTA] -TCC	
<i>vspA</i>	--- (N) 36----- [AGAGTGGACCCCGAAA] ---	
<i>vspB</i>	--- (N) 37----- [AGAGTGGACCCCGAAA] ---	
<i>chs</i>	[CTCCAACCTAACCTCC] -CTT-----	
	[+1]	
<i>p. pinII</i>	CTGAATAGGAG----- (N) 505----- (T)	
<i>lox-3</i>	CAAGACATTTA----- (N) 74----- (A)	
<i>pal</i>	ACCCAACCCGA----- (N) ----- ()	
<i>t. pinI</i>	GTGTGGTTGTT----- (N) 82----- (A)	
<i>p. pinI</i>	TTTCTTCAAAT----- (N) 100----- (A)	
<i>nos</i>	AATTA----- (N) 85----- ()	
<i>vspA</i>	----- (N) 1173----- ()	
<i>vspB</i>	----- (N) 481----- ()	
<i>chs</i>	GAA----- (N) 121----- ()	

Рис. 4. Нуклеотидные последовательности регуляторных предпромоторных участков генов, взаимодействующих с жасмонатом. В скобки заключены потенциальные структуры сайтов взаимодействия с белками-активаторами транскрипции. Указаны положения боксов Ia, Ib, G, IIIa и IIIb и расстояния до старта транскрипции [+1].

G-бокса, можно разделить на три типа. К первому относятся гены *p. pinII*, *lox-3*, в которых бокс Ia представляет собой олигопиримидин-олигопуриновый кластер (с расположенным рядом Z-элементом); такая структура является потенциальным сайтом образования триплексной структуры в суперскрученной ДНК [24 - 26]. Боксы IIIa в генах *p. pinII*, *lox-3* и, с другой стороны, в *vspA* и *vspB* представляют собой инвертированные структуры, которые также можно отнести к потенциальным триплексобразующим структурам. Однако последние два гена принадлежат ко второму типу, так как содержат не бокс Ia, а бокс Ib, представляющий собой Z-элемент. Бокс Ib имеется и в генах третьего типа, *t. pinI*, *p. pinI* и *nos*, а также *pal* (Z-элемент другого вида), которые содержат бокс IIIb (олигопиримидин-олигопуриновый кластер, способный к образованию триплексной структуры).

Выделенные нами белки, взаимодействующие с жасмонатом и, вероятно, являющиеся субъединицами белков-репрессоров транскрипции, при электрофокусировании образуют в геле 4 полосы (рис. 4), и, в соответствии с относительной интенсивностью полос, можно считать, что они характеризуются следующими R_f : α – 4.0, β – 6.65, γ + δ – 4.25 + 4.50.

На базе этих данных мы предполагаем дальнейшие структурно-функциональные исследования взаимодействия репрессоров с индуктором – жасмоновой кислотой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трис, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal); агарозу type I и легкоплавкую агарозу LGT type VII, АТФ, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевины, ос. ч. ("Реахим"); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); [γ - 32 P]АТФ, [α - 32 P]dАТФ (2000 Ки/ммоль, Обнинск); T4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78); Taq-ДНК-полимеразу и ДНК-полимеразу Кленова (КФ 2.7.7.7); модифицированную T7-ДНК-полимеразу; рестриктазные эндонуклеазы (КФ 32.1.23.x) *EcoRI*, *Eco32I* (изошизомер *EcoRV*), *PstI*, *XbaI* (Fermentas, Вильнюс).

Защищенные олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфамидитным методом на синтезаторе ASM-102U ("Биосан", Новосибирск) и после полного деблокирования выделяли как описано в работе [27].

Условия экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, трансформации компетентных клеток, клонированию, а также гель-электрофорезу и выделению ДНК из гелей приведены в работе [28].

Гидролиз рестриктазами проводили в универсальном буфере KGB [29].

ПЦР осуществляли на амплификаторе DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer-Cetus).

Секвенирование ДНК проводили с дидеокси-терминаторами и секвеназой (модифицированной T7-ДНК полимеразой), используя в качестве праймеров олигонуклеотиды А и В (см. рис. 1).

Для анализа белков пробы растворяли в лизирующем буфере [30], нагревали 3 мин при 100°C и белки разделяли в 15% ПААГ в присутствии SDS [30]. Гели прокрашивали кумасси R-250 и сканировали на хроматосканере CS-930 (Shimadzu, Япония).

Изоэлектрофокусирование проводили в 6% ПААГ, используя в качестве амфолитов формалиты фирмы Pharmacia в диапазоне pH 3.0 - 9.5 на приборе Ultraphore Electrofocusing Unit (LKB) при силе тока 20 - 25 мА.

Выделение фрагмента ДНК картофеля. 5 г молодых листьев картофеля замораживали в ступке в жидком азоте, растирали пестиком до получения однородной массы и суспендировали в 10 мл буфера TE (10 мМ трис-НСl, pH 8.0, 1 мМ EDTA). Суспензию озвучивали при 0°C 3 × 10 с помощью ультразвукового дезинтегратора Sonifier 240 (Branson) при А 4.0 и центрифугировали 20 мин при 10000g. К 400 мкл супернатанта прибавляли 45 мкл 3 М Na-ацетата, pH 6.0, и 1200 мкл спирта, выдерживали 2 ч при -30°C и выпавший осадок центрифугировали, промывали 70% спиртом, высушивали и растворяли в 200 мкл буфера TE. Раствор экстрагировали последовательно равными объемами насыщенного буфером TE фенола, смеси фенол-хлороформ и хлороформа. К водной фазе после экстракции прибавляли 20 мкл 3 М Na-ацетата, pH 6.0, и 600 мкл спирта, выдерживали 2 ч при -30°C, выпавший осадок ДНК центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин, промывали 70% спиртом, высушивали и растворяли в 30 мкл буфера TE.

Амплификацию регуляторного фрагмента из ДНК картофеля проводили в 100 мкл инкубационной смеси, содержащей 1 мкл раствора очищенной ДНК в качестве матрицы, по 100 пмоль праймеров А и В, 5'-фосфорилированных с помощью T4-полинуклеотидкиназы и АТФ, сумму dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ), 67 мМ трис-НСl, pH 8.3, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 17 мкг желатина и 5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Для предотвращения испарения на реакционную смесь наслаивали силиконовое масло. Инкубацию проводили в ДНК-амплификаторе в следующем режиме: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 30 с при 52°C, элонгация – 30 с при 72°C. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2.5% агарозном геле и фрагмент длиной 150 п. о. (преимущественный продукт)

выделяли из легкоплавкой агарозы методом вымораживания агарозы [31].

Клонирование регуляторного участка картофельной ДНК. 2 мкг плазмиды pTE2 расщепляли 5 ед. акт. *Eco32I* в 10 мкл 1.5 × KGB 30 мин при 37°C, вектор выделяли после электрофореза в 1% агарозном геле и лигировали с 20 пмоль амплифицированного фрагмента ДНК картофеля, полученного в предыдущем опыте. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* HB101 и высевали на агаризованную питательную среду с 50 мкг/мл ампициллина. Отбор колоний проводили путем гибридизации *in situ* с 5'-³²P-меченым олигонуклеотидом А и строение выделенной стандартным способом плазмиды pTE2pb доказывали рестриктным анализом с помощью рестриктаз *EcoRI* и *XbaI* и секвенированием по Сэнгеру с праймерами А и В.

Получение аффинного сорбента на основе плазмиды pTE2pb. 100 мл ночной культуры *E. coli* HB101 / pTE2pb засеивали 10 л питательной среды YТ (0.5% дрожжевого экстракта, 0.8% триптона и 0.5% NaCl), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и выращивали при 37°C до A_{550} 1.0, затем добавляли спиртовой раствор хлорамфеникола до концентрации 170 мг/л и инкубировали еще 12 ч. Клеточную массу отделяли центрифугированием при 4000g, суспендировали в 100 мл буфера (50 мМ глюкоза, 10 мМ EDTA, 25 мМ трис-НСl, рН 8.0), содержащего 2 мг/мл лизоцима, выдерживали 5 мин при 20°C, прибавляли 200 мл 1% SDS в 0.2 М NaOH, выдерживали 5 мин при 0°C, нейтрализовали при той же температуре 150 мл 3 М ацетата калия (рН 5.4) и через 30 мин центрифугировали при 12000g. Супернатант осаждали 300 мл изопропанола, осадок отделяли центрифугированием при 12000g, промывали 10 мл 70% спирта, высушивали и растворяли в 3 мл буфера TE. Выход плазмиды pTE2pb составил 30 мг.

20 мг плазмиды pTE2pb (20 нмоль) линеаризовали действием 3000 ед. акт. рестриктазы *PstI* в 5 мл 1 × KGB в течение 2 ч при 37°C, раствор экстрагировали 2 мл хлороформа и к водной фазе прибавляли 0.5 мл 3 М ацетата натрия (рН 6.0) и 5 мл изопропанола. Выпавший при 0°C осадок отделяли центрифугированием, промывали 70% спиртом, высушивали и растворяли в 1.5 мл буфера TE.

500 мг легкоплавкой агарозы растворяли в 10 мл буфера (50 мМ трис-НСl, рН 8.0, 100 мМ NaCl, 5 мМ EDTA) при 100°C, охлаждали до 60°C, смешивали с 1.5 мл линеаризованной плазмиды и выливали в чашку Петри. После застывания ДНК-агарозу измельчали протиранием через металлическое сито 25 меш и получали 20 мл аффинного сорбента.

Выделение из картофеля белков-репрессоров, взаимодействующих с жасмоновой кислотой.

100 г молодых листьев картофеля, преинкубированных в течение 24 ч с раствором метилжасмоната (0.1 мМ), замораживали в ступке в жидком азоте и растирали пестиком до получения однородной массы, после чего смешивали с 250 мл экстракционного буфера (50 мМ трис-НСl, рН 8.0, 10 мМ ацетат Mg, 60 мМ KCl, 13 мМ 2-меркаптоэтанол), выдерживали 1 ч при 20°C и центрифугировали 30 мин при 10000g. Осадок суспендировали в 150 мл экстракционного буфера и обрабатывали 10 × 20 с ультразвуком с помощью дезинтегратора Sonifier 240 (Branson) при А 4.0 и снова центрифугировали 30 мин при 10000g. Объединенный экстракт осветляли 3 г активированного угля и затем высаливали сульфатом аммония (80% насыщения). Выпавший осадок отделяли центрифугированием (30 мин при 10000g) и растворяли в 50 мл 5 мМ трис-НСl, рН 7.5. Для освобождения от следов связанной картофельной ДНК полученный раствор перемешивали 30 мин с 50 мл уравновешенного тем же буфером DEAE-Sephacell (Pharmacia) и затем промывали сорбент в колонке 400 мл 1 М NaCl в том же буфере. Элюат концентрировали до объема 50 мл и диализовали против буфера А (10 мМ трис-НСl, 5 мМ ацетат Mg, 25 мМ NaCl, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 5% глицерин).

Для предотвращения неспецифической сорбции белков картофеля на аффинном сорбенте к раствору суммарного белка прибавляли тимусную ДНК, предварительно обработанную ультразвуком (3 × 20 с при А 2.0), до ее концентрации в растворе 0.5 мг/мл и после выдержки 30 мин при 0°C выпавший незначительный осадок удаляли центрифугированием. Подготовленный раствор суммарного белка медленно наносили на колонку с аффинным сорбентом (5 мл/ч) и сорбент промывали 4 объемами буфера А (фракция 1). Для десорбции белки смывали 3 объемами того же буфера А, содержащего 4 мг/л метилжасмоната. Элюат (фракция 2) содержал 4 белка в молярном соотношении 2 : 4 : 1 : 1 (см. рис. 2). Десорбцию оставшихся в колонке белков проводили 0.5% раствором SDS в 10 мМ трис-НСl, рН 7.5 (фракция 3), и затем снова уравновешивали колонку буфером А.

К подготовленному исходному раствору суммарного белка (см. выше) прибавляли раствор MJ до концентрации 4 мг/л, медленно наносили на промытую колонку с аффинным сорбентом и затем десорбировали 0.5% SDS. В полученной фракции 4 (рис. 2) содержались белки α , γ и δ , но не обнаруживался белок β .

Авторы выражают благодарность А.Б. Бургутину (ИФР РАН) за предоставленные стерильные проростки картофеля, А.Л. Каюшину и М.Д. Коростелевой за синтез олигодезонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gross D., Parthier B. // J. Plant Growth Regulation. 1994. V. 13. P. 93 - 114.
2. Parthier B. // Bot. Acta. 1991. V. 104. P. 446 - 454.
3. Sembdner G., Parthier B. // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1993. V. 44. P. 569 - 589.
4. Cleveland T.E., Thornburg R.W., Ryan C.A. // Plant Mol. Biol. 1987. V. 8. P. 199 - 207.
5. Keil M., Sanchez-Serrano J., Schell J., Willmitzer L. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 5641 - 5650.
6. Lee J.S., Brown W.E., Graham J.S., Pearce G., Fox E.A., Dreher T.W., Ahern K.G., Pearson G.D., Ryan C.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 7277 - 7281.
7. Yenofsky R.L., Fine M., Liu C. // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 211. P. 215 - 222.
8. Rhee Y., Staswick P.E. // Plant. Physiol. 1992. V. 98. P. 792 - 793.
9. Rhee Y., Staswick P.E. // Plant. Physiol. 1992. V. 98. P. 794 - 795.
10. Filpula D., Vaslet C.A., Levy A., Sykes A., Strausberg R.L. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 11381.
11. Schulze-Lefert P., Dangl J.L., Becker-Andre M., Hahlbrock K., Schulz W. // EMBO J. 1989. V. 8. P. 651 - 656.
12. Ebert P.R., Ha S.B., An G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 5745 - 5749.
13. Kim S.-R., Choi J.-L., Costa M.A., An G. // Plant. Physiol. 1992. V. 99. P. 627 - 631.
14. Mason H.S., De Wald D.B., Mullet J.E. // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 241 - 251.
15. Donald R.G.K., Schindler U., Batschauer A., Cashmore A.R. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 1727 - 1735.
16. Schindler U., Terzaghi W., Beckmann H., Kadesch T., Cashmore A.R. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1275 - 1289.
17. Guiltinan M.J., Marcotte W.R., Jr., Quatrano R.S. // Science. 1990. V. 250. P. 267 - 271.
18. An G., Costa M.A., Ha S.-B. // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 225 - 233.
19. Kim S.-R., Kim Y., An G. // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 97 - 103.
20. Гуревич А.И., Скапцова Н.В., Луценко С.В., Смирнов В.А., Куркин А.Н., Ажаев А.В. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. С. 647 - 652.
21. Weideli H., Gehring W.J. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 104. P. 5 - 11.
22. Ansevin A.T., Wang A.H. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6119 - 6126.
23. Luthman K., Behe M.J. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 15535 - 15539.
24. Hanvey J.C., Shimizu M., Wells R.D. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 5950 - 5956.
25. Shimizu M.C., Hanvey J.C., Wells R.D. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 5944 - 5949.
26. Francois J.-C., Saison-Behmoras T., Thuong N.T., Helene C. // Biochemistry. 1988. V. 29. P. 9617 - 9619.
27. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. С. 629 - 632.
28. Гуревич А.И., Некрасова О.В. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. С. 149 - 152.
29. McClelland M., Hanish J., Nelson M., Patel Y. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 364.
30. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
31. Lian Qian, Wilkinson M. // BioTechniques. 1991. V. 10. P. 736 - 737.

Mode of Action of a Plant Hormone, Jasmonic Acid.

1. Jasmonic Acid-interacting Proteins That Regulate Transcription of the *p. pinII* Gene from Potato

A. I. Gurevich,¹ T. P. Tuzova, E. D. Shpak, N. N. Starkova, R. S. Esipov, and A. I. Miroshnikov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

Abstract—A fragment containing the regulatory region of the *p. pinII* gene was isolated from potato DNA by polymerase chain reaction. Interactions of this DNA region with jasmonate determines the transcriptional activation. The isolated DNA fragment was cloned into the pTE2pb plasmid, which was used for preparing an affinity sorbent. Using this sorbent, four proteins were isolated from the total protein capable of desorption at physiological concentration of jasmonate. These proteins are likely to be subunits of two transcription repressors, whereas jasmonate serves as an inducer. Three sequences of the regulatory regions (boxes G, I, and III) are binding sites for repressors; similar sequences were found in various plant genes activated by jasmonate.

Key words: jasmonic acid, hormonal regulation, regulatory regions, transcription, repressor protein.

¹ To whom correspondence should be addressed.