

КОНСТРУИРОВАНИЕ БИНАРНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ПЕРЕНОСА И ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *hrpJ* И *hrpW* В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКЕ*

Effectiveness of bacterial gene expression in plant cells depends on different factors, first and foremost on the nucleotide composition of this gene. Essential conditions of effective realization of prokaryotic genetic information are adequacy of codon usage frequency of transferred gene and plant DNA, and absence of sequences, which can be recognized as sites of splicing. Our investigations showed, that sequence of bacterial genes *hrpJ* and *hrpW*, which are to be transferred into plant genome do not need preliminary modifications. Binary vectors for transfer and effective expression of *hrpJ* and *hrpW* were constructed.

Эффективность экспрессии бактериальных генов в клетках растений зависит от многих факторов и прежде всего от нуклеотидного состава экспрессируемого гена. Необходимыми условиями успешной реализации прокариотической генетической информации являются соответствие частот использования кодонов экспрессируемого гена и ДНК растения, а также отсутствие в их нуклеотидных последовательностях областей, которые могут распознаваться в реципиентных клетках как интроны.

Для изучения экспрессии бактериальных генов в растениях в качестве модельного объекта был выбран вид табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana* SR1, а в качестве бактериальных генов - гены фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* *hrpJ* и *hrpW*. Эти гены относятся к бактериальной системе секреции белков третьего типа, и их продукты представляют собой белки «харпины» (от Hrp - hypersensitive reaction proteins), которые играют важную роль в индукции заболевания у чувствительных растений и способны самостоятельно вызывать реакцию гиперчувствительности у устойчивых.

Материал и методика

Анализ нуклеотидной последовательности бактериальных генов проводили с использованием следующих компьютерных программ и баз данных: GENSCAN - поиск интронов и поли-А-сигналов [1], Codon Usage Database - определение частот использования кодонов [2], а рестрикцию, легирирование и электрофорез - общепринятыми методами [3].

Для амплификации фрагментов ДНК использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Матрицей служила плазмидная ДНК. Реакция протекала в амплификаторе «GeneAmp PCR System 2700» (Amersham, Швеция) согласно общепринятой методике [4]. Условия амплификации были подобраны экспериментально. Праймеры для ПЦР были сконструированы на основе информации из базы данных нуклеотидных последовательностей (GeneBank; EMBL Data library) и результатов секвенирования.

Результаты и их обсуждение

Прежде чем приступить к клонированию генов харпинов, мы проанализировали их нуклеотидную последовательность, чтобы, во-первых, выяснить, насколько их кодоновый состав соответствует частоте использования кодонов в экспериментальном организме (*Nicotiana tabacum*), а во-вторых, определить, есть ли в последовательности генов харпинов области, которые могут подвергаться сплайсингу при созревании мРНК. Такой анализ очень важен, поскольку позволяет установить, нуждается ли нуклеотидная последовательность генов харпинов в модификациях для эффективной экспрессии в клетках растений.

Сравнительный анализ частоты использования кодонов бактериальных генов у *Nicotiana tabacum* показал, что использование переносимых кодонов в клетках табака составляет не менее 7 %. Это позволяет заключить, что нуклеотидная последовательность генов *hrpJ* и *hrpW* не содержит редкие для табака кодоны и, следовательно, трансляция этого гена в клетках модельного организма будет проходить эффективно (таблица). Помимо этого, анализ транскриптов генов не выявил в их последовательностях возможные области для альтернативного сплайсинга в эукариотических клетках.

* Авторы статьи - сотрудники кафедры молекулярной биологии.

Использование кодонов в нуклеотидных последовательностях генов у модельного организма (*Nicotiana tabacum*) и генов *hrpJ* и *hrpW*

Аминокислота	Кодоны	Использование кодона, %		
		<i>N. tabacum</i>	<i>hrpJ</i>	<i>hrpW</i>
Ala	GCA	31	11	18
	GCC	17	43	47
	GCG	8	41	24
	GCT	44	4	12
Arg	AGA	31	3	0
	AGG	26	3	0
	CGA	11	7	25
	CGC	8	52	50
	CGG	8	28	25
	CGT	16	7	0
Asn	AAC	41	42	68
	AAT	59	58	32
Asp	GAC	32	35	47
	GAT	68	65	53
Ctop	TAA	43	0	0
	TAG	18	0	0
	TGA	38	100	100
Gin	CAA	58	28	42
	CAG	42	73	58
Glu	GAA	54	68	62
	GAG	46	32	38
Gly	GGA	34	7	9
	GGC	17	47	39
	GGG	15	13	19
	GGT	34	33	33
His	CAC	41	33	44
	CAT	59	67	56
He	ATA	23	7	13
	ATC	26	47	50
	ATT	51	47	38
Leu	CTA	10	8	9
	CTC	14	13	0
	CTG	12	69	57
	CTT	27	4	17
	TTA	13	2	11
	TTG	24	4	6
Lys	AAA	48	93	62
	AAG	52	7	38
Met	ATG	100	100	100
Phe	TTC	43	38	57
	TTT	57	63	43
Pro	CCA	40	14	17
	CCC	14	27	21
	CCG	9	59	25
	CCT	38	0	38
Ser	AGC	13	36	21
	AGT	17	10	11
	TCA	23	5	17
	TCC	14	18	23
	TCG	7	31	9
	TCT	27	0	19
Thr	ACA	32	13	6
	ACC	19	25	52
	ACG	8	46	21
	ACT	41	17	21
Trp	TGG	100	100	100
Tyr	TAC	44	25	100
	TAT	56	75	0
Val	GTA	17	6	10
	GTC	17	35	19
	GTG	25	59	38
	GTT	41	0	33

Для клонирования в бинарный вектор pBI121 бактериальные гены были амплифицированы в ходе ПЦР с праймерами:

hrpJ+ (5' GTCGACATGATCAAAATGCTGACTGTC3'),

hrpJ- (5' TCTAGATCATGGCTGCTCCTTATCCG3'),

hrpW+ (5' GTCGACATGGCTGATATGACGATTAC3'),

hrpW- (5' TCTAGATAAATTCACCTGTAAGTTGGCG3').

Условия реакции подбирали экспериментально: денатурацию проводили при 94 °С, отжиг праймеров - при 62 °С. полимеризацию осуществляли с использованием Taq-полимеразы при 72 °С в течение 90 с.



Структура Т-области сконструированных Бинарных векторов (лг, пг - левая и правая границы Т-области; NOS-промотор - промотор неопалинсинтазы; *nptII* - ген неомycin фосфотрансферазы; обеспечивающий устойчивость к канамицину; NOS-терминатор - терминатор неопалинсинтазы; 35S - промотор вируса пятнистости цветной капусты (CaMV))

Амплифицированные фрагменты были клонированы в бинарный вектор с помощью введенных в последовательности праймеров сайтов для рестриктаз *SaiI* и *XbaI*. Сконструированные таким образом плазмиды pBiP-J и pBiP-W несли полные кодирующие последовательности генов *hrpJ* и *hrpW* соответственно, помещенных непосредственно за эукариотическим промотором (35S) и перед эукариотическим терминатором, что обеспечивает их транскрипцию в эукариотическом геноме (рисунок).

1. <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>
2. <http://www.kazusa.or.jp/codon/>
3. Маниатис Т. и др. Молекулярное клонирование. М., 1984. С. 89.
4. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. Current Protocols In Molecular Biology. 1992.

Поступила в редакцию 27.06.06

Ольга Константиновна Присяженко - аспирант. Научный руководитель - А.Н. Евтушенков.

Анатолий Николаевич Евтушенков - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой.