

УДК 577.21.6.31

© 1992 г.

Т. Ф. ГУРОВА, В. Е. СЕМЕНЕНКО

**БИБЛИОТЕКА ГЕНОВ *DUNALIELLA SALINA*, ПОЛУЧЕННАЯ
В КОСМИДНОМ ВЕКТОРЕ НОВОЙ КОНСТРУКЦИИ**

Получен банк генов одноклеточной зеленой водоросли *Dunaliella salina* с применением космидного вектора, исключающего появление рекомбинантных клонов, не содержащих вставки чужеродной ДНК. Общий размер космидного банка 56 160 клонов. Средний размер вставок 35—45 тпн. Выделено два клона, гибридизующихся с геном малой субъединицы РБФК гороха.

Среди одноклеточных зеленых водорослей *Dunaliella salina* привлекает внимание исследователей как перспективный биотехнологический объект. Благодаря своим физиологическим свойствам — отсутствию клеточной стенки и способности расти в среде с высоким содержанием соли, *D. salina* используется как продуцент кормового белка и биопрепаратов. Способность накапливать глицерин и растительный β -каротин, который является провитамином А, явилась основой для промышленного культивирования водоросли *D. salina* во многих странах [1, 2, 3]. Варьированием условий выращивания водоросли — изменением содержания соли в среде [4], температуры и условий освещения [5] — можно добиться увеличения содержания каротина в 11 раз. Показана связь между фотосинтетической активностью ферментов синтеза каротина и интенсивностью света.

Отсутствие клеточной стенки у дуналиеллы позволяет успешно применять ее для генетических и генно-инженерных работ; так как облегчается возможность генетической трансформации клеток водоросли, а также извлечение нуклеиновых кислот или вторичных продуктов. Генетические модификации водорослей — это еще одна помимо физиологических факторов возможность увеличения выхода целевого продукта. Регуляторные мутации, вызванные различными мутагенами либо клонированием генов, приводят к нарушению естественных механизмов контроля за экспрессией генов, что может быть использовано для получения суперпродуцентов. Многие гены водоросли, в том числе, по-видимому, и комплекса ферментов синтеза каротина, являются светозависимыми и светорегулируемыми. Изучению организации таких генов посвящен ряд работ, выполненных на высших растениях, а также на некоторых водорослях [6—9]. Положено начало исследованию светорегулируемых процессов у дуналиеллы на генетическом уровне [10, 11], тогда как их физиология довольно хорошо изучена. Особый интерес представляет организация взаимозависимых хлоропластных и ядерных генов, их светочувствительных областей. Получение геномной библиотеки является необходимым этапом решения подобных проблем, связанных с исследованием структурной организации и регуляции генов. Поэтому нашей задачей являлось получение представительной библиотеки генов *D. salina*, содержащей клоны с крупными фрагментами ядерной и хлоропластной ДНК изучаемой водоросли.

Методика

Высокополимерную ДНК *D. salina* выделяли методом заплывания суспензии клеток водоросли в 1%-ную легкоплавкую агарозу и последующей депротенизации в буфере, содержащем 0,5 М ЭДТА, рН 8,0, 1%-ный саркозил и 1 мг/мл протеиназы К в течение 12 ч при 55° [12]. Подбор условий для частичного гидролиза полученной ДНК рестриктазой Sau 3A также проводили в слое легкоплавкой агарозы в стандартном среднесолевом буфере с добавлением 0,01 мМ фенолметилсульфонилфторида для ингибирования протеиназы К. Размеры исходной ДНК *D. salina* определяли электрофорезом в пульсирующем поле на приборе оригинальной конструкции [13], используя мультимеры фага λ в качестве маркеров молекулярного веса.

Для обработки приготовленной ДНК рестриктазой Sau 3A требовалось 26 ед. фермента на 1 μ ДНК, что на порядок больше, чем это необходимо в обычных условиях. Время обработки для получения фрагментов 37—45 тпн (тысячи пар нуклеотидов) составляло 1,5 ч. Маркерами набора фрагментов нужного размера служили ДНК фага SP6, рестриктированная KpnI, и нативная ДНК фага λ .

Фрагменты ДНК размером 37—45 тпн, полученные в результате частичного гидролиза, вырезали из геля 0,4%-ной легкоплавкой агарозы, элюировали 0,1 М трис-ацетатом и экстрагировали смесью фенол/хлороформ. В качестве вектора для клонирования использовали космиду pBbv-cosII, производную от космиды pHC-79, в которой делетированы два сайта (1855 и 4355) для рестриктазы BbvII [14] и участок хромосомы *E. coli* размером 500—600 пн. Плечи космидного вектора получали путем обработки космиды pBbv-cosII тремя рестриктазами: EcoRV, BbvII и BamHI с последующим выделением двух больших фрагментов препаративным электрофорезом.

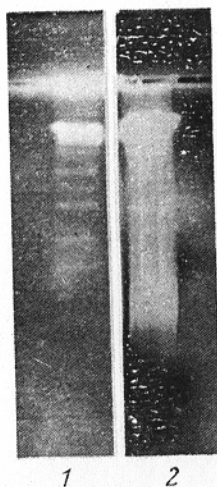
Лигирование и упаковку проводили, как указано в книге Маниатиса [15], используя упаковочные экстракты из штаммов *E. coli* ВНВ 2688 и ВНВ 2690, приготовленные по методу (1). Хозяйским штаммом служил *E. coli* ДН1.

ДНК космид выделяли щелочным методом. Гибридизацию *in situ* и гибридизацию на фильтрах по Саузерну проводили также по Маниатису. Радиоактивным зондом служил меченый ³²P в реакции ник-трансляции фрагмент плазмиды pSR6, содержащий один из генов малой субъединицы РБФК гороха [16] и плазмиды pUC 18 с фрагментом хлоропластного гена апопротеина Р 700 фотосистемы I.

Результаты и их обсуждение

Мягкий метод выделения ДНК в «агарозной подушке» позволил получить высокополимерную ДНК *D. salina* размером 300—400 тпн (рис. 1). Применявшийся нами ранее [17] метод Блина и Стаффорда позволял получать исходную ДНА не более 80 тпн. Таким образом, благодаря методу Карле и Олсона в применении к суспензии одноклеточных водорослей удалось выполнить одно из важнейших требований составления космидных библиотек — использовать исходную ДНК высокого качества и степени полимерности. Для установления оптимального соотношения концентрации плечей вектора и встраиваемой ДНК было поставлено несколько пробных реакций лигирования и упаковки. Наилучшим оказалось соотношение 0,4 μ плечей вектора на 1 μ ДНК *D. salina*. В отличие от данных Фричауфа [18], в нашем случае при увеличении концентрации вектора и соотношении 1 μ вектора на 1 μ встраиваемой ДНК эффективность упаковки снизилась до нуля. При оптимальных условиях эффективность упаковки фага λ составляла $7,2 \cdot 10^7$ негативных колоний на 1 μ ДНК. Упаковка расщепленных и лигированных векторных молекул без чужеродной ДНК приводила к образованию 1—2 колоний на 400—600 рекомбинантов. Отсутствие

Рис. 1. Анализ ДНК *D. salina* пульс-электрофорезом в 1%-ной агарозе. 1 — Мультимеры фага λ (от 50 до 300 тпн); 2 — необработанная рестриктазой ДНК *D. salina*



восстановления вектора при лигировании плеч самих на себя свидетельствует о том, что не происходит образования поликосмид, которые были бы способны упаковываться *in vitro* и тем создавать фон космид без вставок. При использовании космиды нашей конструкции, таким образом, нет необходимости дефосфорилировать ДНК перед лигированием, которое снижает эффективность клонирования [19]. Эффективность упаковки ДНК *D. salina* составила $1,9 \cdot 10^4$ и общий размер банка $56,16 \cdot 10^3$ колоний. Пользуясь известной статистической формулой [20], можно подсчитать, что для генома водоросли $2 \cdot 10^7$ пн и вероятности клонирования каждого фрагмента в 30 тпн, равной 99%, для обнаружения уникальной последовательности необходимо проанализировать 3067 рекомбинантов, а для фрагмента в 40 тпн число рекомбинантов должно быть 2044, т.е. среди $56\,160$ полученных нами рекомбинантных колоний можно обнаружить все неперекрывающиеся фрагменты генома *D. salina*. При анализе более 500 Ar^rTc^s клонов быстрым скринингом оказалось, что 90% их содержат вставку. На рис. 2 показан рестриктный анализ нескольких произвольно выбранных клонов. При обработке рестриктазой *EcoRV*, за исключением клонов 19 и 23, получается разный набор фрагментов. Во всех клонках присутствует фрагмент космиды 3,59 тпн. Суммированием набора фрагментов можно подсчитать приблизительный размер вставки — около 35—45 тпн. При обработке ДНК тех же клонов рестриктазой *Pst I* набор фрагментов получается иным, образуются более мелкие фрагменты, среди которых во всех клонках также присутствуют фрагменты космиды около 3,5 тпн, соответствующие плечам космиды. Гибридизацией *in situ* (рис. 3) 50 клонов с меченым ^{32}P -фрагментом гена малой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы гороха отобраны 12 клонов с наиболее сильным положительным сигналом. Блот-гибридизация ДНК этих клонов позволила выбрать только два клонка, гибридирующихся с геном малой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы гороха.

Отмечен также положительный сигнал четырех клонов с фрагментом хлоропластного гена *PSa (A)* шпината. Таким образом, проделанная работа позволяет предположить, что в полученном банке содержатся вставки как ядерной, так и хлоропластной ДНК *D. salina*.

В настоящее время известна единственная работа по клонированию светочувствительных генов фотосинтеза у дуналиеллы [21]. Лонгом с соавторами

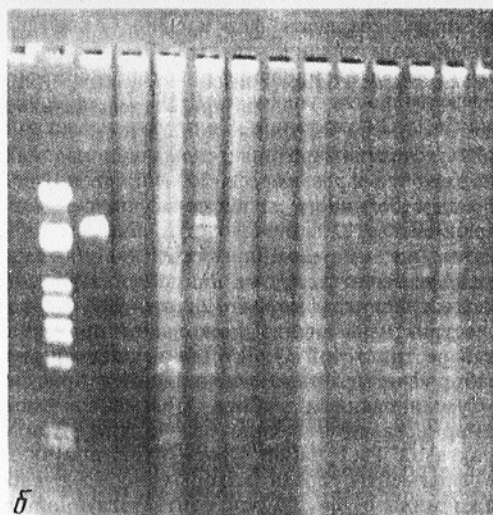
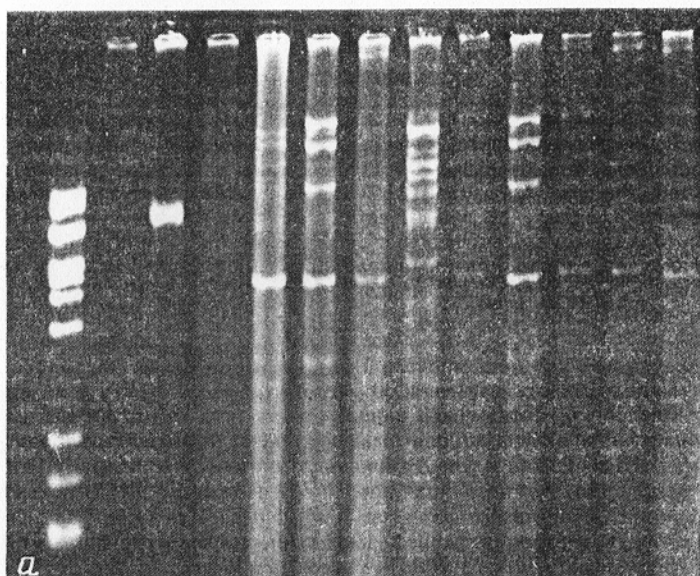


Рис. 2. Электрофореграмма рестриктных фрагментов ДНК рекомбинантных клонов, стрелкой указаны фрагменты космиды. Номера дорожек: *a* — 1 — ДНК фага λ , обработанная *EcoRV*; 3 — ДНК космиды pBbv-cos II, нативная; 4—13 — ДНК рекомбинантных клонов 17—27, обработанных *EcoRV*; *b* — 1 — ДНК фага λ , обработанная *PstI*; 2 — ДНК космиды pBbv-cos II; 3—12 — ДНК рекомбинантных клонов 17—26, обработанных *PstI*

была определена нуклеотидная последовательность, содержащая 2544 пары оснований, — это полный кодирующий район САВ-гена (ген хлорофилл *a/b* связывающего белка светособирающего комплекса) и 5'-3'-фланкирующие последовательности. Наличие в проанализированных нами космидных клонов крупных вставок чужеродной ДНК открывает возможность для выделения полных

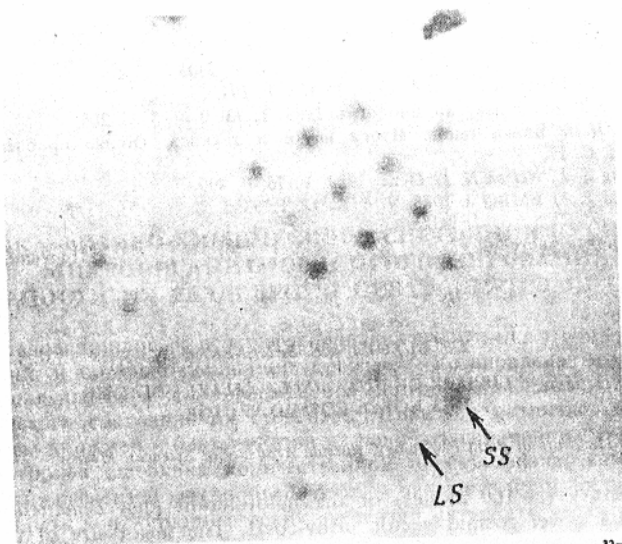


Рис. 3. Гибридизация *in situ* рекомбинантных клонов с меченым ^{32}P -фрагментом гена малой субъединицы РБФК гороха. В качестве контроля (указано стрелками) нанесены клоны с плазмидами, содержащими фрагменты генов малой (SS) и большой (LS) субъединиц РБФК

генов, межгенных пространств и целых генных семейств внутри одной рекомбинантной молекулы. Так, у высших растений, например, петунии [22], пять генов малой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы лежат внутри области 22 тпн ядерной ДНК петунии. Предстоит определить, как организованы подобные гены у *D. salina*. То же касается и других генов, объединенных в мультигенные семейства, например генов синтеза хлорофилла и каротиноидов. Использование банка позволяет изучать, регулировать и использовать в нужных целях природные свойства выбранной нами водоросли генно-инженерными способами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы его практического использования. Киев: Наук. думка, 1973. С. 70.
2. Ven-Amotz A., Avron M. // J. Phycol. 1982. V. 18. P. 529.
3. Гелескул Ю.Ф. // Химическая технология. 1982. Вып. 6. С. 40.
4. Borowitzka J., Borowitzka M.A., Moulton T. // Hydrobiologia. 1984. V. 116. P. 115.
5. Семененко В.Е., Абдулаев А.А. // Физиология растений. 1980. Т. 27. Вып. 1. С. 31.
6. Tobin E.M., Silverthorn J. // Annual Rev. Plant Physiol. 1985. V. 36. P. 367.
7. Семененко В.Е. // Фотосинтез и продукционный процесс. М.: Наука, 1988. С. 69.
8. Sagar A.D., Briggs W., Tompson W.F. // Plant Physiol. 1988. V. 88. № 4. P. 1397.
9. Nagy F., Bouty M., Hsu M.-J. et al. // EMBO J. 1987. V. 6. № 9. P. 2537.
10. Лось Д.А., Гурова Т.Ф. Тез. докл. II Всесоюз. конф. мол. уч. по физиол. раст. клетки. 1986. М.: Изд. ИФР АН СССР. С. 80.
11. Семененко В.Е., Штובה Л.А. Тез. докл. 16-й конф. ФФБО. 1984. С. 253.
12. Carle G., Olson M.V. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 5647.
13. Берташвили Д.Р., Поletaев А.И., Твердохлебов В.Н. А.с. 1670563 // Опул. Б.И. 1991. № 30. С. 176.
14. Matvienko N.I., Pachkunov D.M., Kratarov V.M. // FEBS Let. 1984. V. 177. № 1. P. 23.
15. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 255—290.

16. *Cashmore A.R.* // Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective / Eds Kosuge Ts., Meredith C.P., Hollander A. N.Y.: Plenum Press, 1983. P. 29.
17. *Blin N., Stafford D.W.* // Nucl. Acids Res. 1976. V. 6. P. 2303.
18. *Frichauf A.-M.* // Meth. in Enzymol. 1987. V. 152. P. 191.
19. *Забаровский Е.Р.* // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. Вып. 5. С. 205.
20. *Матвиенко Н.И.* Банки генов. Итоги науки и техники. Общие проблемы биологии. 1982. Т. 1. М, С. 17.
21. *Long Z., Wang S.-J., Nelson N.* // Gene. 1989. V. 76. P. 299.
22. *Dean C., Elzen P.* // EMBO J. 1985. V. 4. № 12. P. 3055.

Институт физиологии растений
РАН, Москва

Поступила в редакцию
10.09.1990

T.F. GUROVA, V.E. SEMENENKO

GENE LIBRARY OF *DUNALIELLA SALINA* OBTAINED
IN A NOVEL COSMID VECTOR

Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The gene library (56 160 clones) of the halotolerant alga *Dunaliella salina* was obtained using a novel cosmid vector pBbv-cosII. The mean size of the insertions is 35—45 kb. Hybridization screening demonstrated that both nuclear and chloroplast DNA-containing clones are presented in the library.