

УДК 577.21:579.842.11

ВПЛИВ ARS-ФЛАНКУЮЧИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ НА СТАБІЛЬНІСТЬ БІРЕПЛІКОННИХ *PICHA GUILLIERMONDII*/ *ESCHERICHIA COLI* ПЛАЗМІД У КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ

О. Халімончук, А. Петришин, Ю. Пиняга, Д. Федорович, А. Дорош,
Ю. Борецький

Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова 14/16, м. Львів 79005, Україна,
e-mail: okhalimonchuck@yahoo.com

ARS елемент *Pichia guilliermondii* субклонований на векторах pUC19 та модифікованому pBR322 у складі 0,82 т.п.н. фрагмента хромосомної ДНК. На базі новоотриманих векторів сконструйовано низку плазмід. Досліджено залежність стабільності сконструйованих плазмід від довжини нативних ARS-фланкуючих ділянок. Збільшення розмірів ARS вмісної послідовності підвищує стабільність плазмід у чотири-шість разів.

Отже, розмір нативних ARS-фланкуючих послідовностей є важливою для стабільності плазмід у клітинах *P. guilliermondii*.

Ключові слова: дріжджі, *Pichia guilliermondii*, ARS-фланкуючі послідовності, стабільність плазмід.

На сучасному етапі вивчення молекулярних механізмів регулювання біосинтезу рибофлавіну (РФ) у дріжджів *Pichia guilliermondii* виникає необхідність клонування та аналізу не тільки структурних генів біосинтезу РФ, але й генів, які кодують регуляторні фактори, що контролюють цей процес.

Одним із шляхів, що міг би забезпечити клонування генів у гомологічній дріжджовій системі, є трансформація банком генів відповідного мутантного штаму дріжджів і відбір клонів, у яких відновився фенотип дикого типу, з подальшим „рятуванням” (plasmid rescue) рекомбінантних плазмід.

Необхідною передумовою для успішного виконання цієї частини роботи є наявність бірепліконних векторів, достатньо стабільних у клітинах дріжджів.

Головна характеристика таких векторів – наявність репліконів еукаріот (ARS-елемент) і прокаріотичних організмів (*ori*-послідовність). Такі вектори можна успішно вводити як у бактерійну, так і в дріжджову клітини. Використання висококопійних векторів дає змогу отримувати препаративні кількості клонованого матеріалу з протрансформованих штамів *E. coli*, однак у разі клонування низки дріжджових генів, продукти яких є токсичними для бактерій, застосування таких векто-

рів не є оптимальним. Імовірність успішного клонування таких генів зростає у випадку використання низькокопійних векторів.

З урахуванням описаних вище фактів сконструйовано два типи (низько- та висококопійний у клітинах *E.coli*) бірепліконних векторів.

Використовували штами *E.coli*: C600 [F⁻ e14⁻ (McrA⁻) thr-1 leuB6, thi-1 lacY1 supE44 rfbD1 thuA21 EcoK r⁺m⁺ McrBC⁺], XL1 [F[']::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ) M15 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (rk⁻ mk⁺) supE44 relA1], мутант rfbB802-45 [F⁻ e14⁻ (McrA⁻) lacY1 supE44 galK2 galT22 rfbD1 metB1 mcrB1 hsdS3 (rk⁻ mk⁻)] із заблокованою РФ-синтазою, а також РФ-залежний мутант *P.guilliermondii* rfb7-162 з пошкодженим rfb7 геном.

Для конструювання векторів застосовували плазмиди pBR322 [5], pUC19 [6] та p19R1 [4].

Усі маніпуляції з рекомбінантними ДНК виконували за Маніатісом і співавторами [1].

Оскільки раніше спостережено, що 3'-ARS-фланкуюча послідовність є необхідною для відновлення фенотипу дикого типу в трансформантів *P.guilliermondii*, то виділяли фрагмент ДНК, що містить фланкований з обох боків ARS-елемент. Потрібний фрагмент (0,82 т.п.н.), що містить ARS-послідовність разом із 3'-фланкуючою ділянкою і частиною гена *RIB1* (5'-фланкуюча ділянка), виділяли з плазмиди p19R1 і очищали шляхом елюції з гелю. Елюйований *HincII* фрагмент розміром 0,82 т.п.н. лігували в *HincII* сайт pUC19. Ліговану суміш трансформували в клітини *E.coli* XL1. Трансформанти відбирали на середовищі LB + X-Gal (4 мкг/мл) + IPTG (0,1 мМ) та аналізували плазмідну ДНК із незабарвлених колоній. Одержана плазміда (pUC-ARS) була важчою, ніж вихідний вектор pUC19 на 0,82 т.п.н. Отриманий таким способом вектор pUC-ARS використали для конструювання іншого вектора з меншою копійністю. Для цього виконували рестрикцію ДНК pBR322 ендонуклеазою *Bam*HI. Одержаний рестрикт гідролізували екзонуклеазою *Bal*31 (швидкість гідролізу 100 п.н./хв), обробляли Кленовським фрагментом, лігували й трансформували в клітини *E.coli* C600. Плазмідну ДНК із отриманих трансформантів порівнювали з вихідним вектором pBR322. Так був відібраний клон *E.coli*, що містив зменшений на 0,5 т.п.н. вектор без *Bam*HI сайту. На наступному етапі роботи *Eco*RI-*Hind*III фрагмент вектора pUC-ARS (*Hinc*II фрагмент із частиною полілінкера, 0,87 т.п.н.) був клонований по гомологічних *Eco*RI- і *Hind*III-сайтах на зменшеному pBR322. Рестрикційний аналіз засвідчив, що одержана плазміда має розмір близько 4,9 т.п.н. і відповідає запланованій конструкції.

Для дослідження впливу ARS-фланкуючих ділянок на стабільність плазмід у клітинах дріжджів у склад векторів pPE-19 та pUC-ARS введено ген РФ синтази (*RIB7*) *P.guilliermondii*. Вектор pPE-19 відрізняється від pUC-ARS відсутністю нативних ARS-фланкуючих ділянок [3]. Сконструйовані плазмиди відрізнялись також розміром клонованого фрагмента ДНК, що містить ген *RIB7*. Схема плазмід

показана на рисунку. У випадку плазмід pPER7-3 та pUCAR7 розмір клонованого фрагмента становив 1,7 т.п.н., а у випадку плазміди pPESR7 – 3,7 т.п.н. Фрагмент

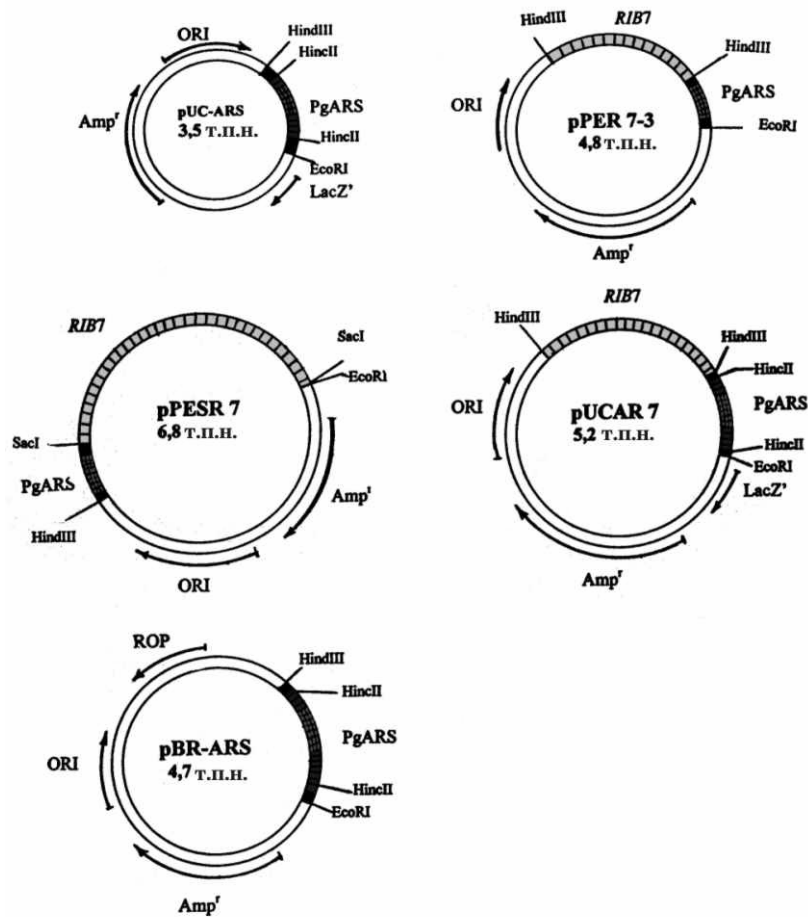


Схема сконструйованих плазмід і векторів.

RIB7 локуса розміром 1,7 т.п.н. містив частину промоторної ділянки цього гена розміром 0,3 т.п.н. тоді як фрагмент 3,7 т.п.н. – повну промоторну послідовність. Плазміді відрізнялись також за довжиною клонованих ARS-вмісних фрагментів: 0,24 т.п.н. (pPER7-3 та pPESR7), 0,82 т.п.н. (pUCAR7) (див. рисунок). З метою вивчення стабільності рекомбінантних плазмід у клітинах дріжджових трансформантів проведено трансформацію штаму РГ-162 (*rib7*-162) описаними вище рекомбінантними плазмідами. Трансформанти відбирали на середовищі без РФ. Як відомо, характерною ознакою автономного статусу плазміди в клітині дріжджового транс-

форманта є менший розмір колонії порівняно з трансформантом, у якого плазмідна інтегрувала в геном [2]. У нашому випадку отримані РФ-прототрофи утворювали на агаризованому середовищі великі й малі колонії. Малі за розміром колонії для плазмід рPER7-3 становили 20% від загальної кількості трансформантів, для плазмід рPESR7 – 32 %, а у випадку використання вектора рUCAR7 – 79 %. Трансформанти, які утворювали малі колонії, були генетично нестабільними. У разі їхнього розсівання розсіві більшість новоутворених колоній були великого розміру. Лише 2,7 % у випадку плазмід рPER7-3, 15,6 % у випадку рPESR7 і 17,4 % у випадку рUCAR7 залишалися дрібними. Під час пересівання колоній трансформантів великого розміру утворення дрібних колоній не спостерігали, що, очевидно, свідчить про інтеграцію трансформованої ДНК в геном реципієнта.

Отже, наявність нативних ARS-фланкуючих ділянок на фрагменті 0,82 т.п.н. (порівняно з фрагментом 0,24 т.п.н) та збільшення промоторної області клонованого гена призводить до підвищення стабільності бірепліконного вектора в клітинах трансформантів *P.guilliermondii*.

У результаті цієї роботи сконструйовано низку плазмід, які мають різну копійність у клітинах *E.coli*, несуть унікальні сайти, придатні для конструювання банку генів, мають підвищену стабільність у клітинах *P.guilliermondii* і є перспективними для подальших досліджень молекулярно-генетичних механізмів регуляції біосинтезу РФ у цього виду дріжджів.

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480 с.
2. Саснаускас К.В., Гядвилайте А.А., Янулайтис А.А. Клонирование ADE2 гена *Saccharomyces cerevisiae* и локализация ARS-последовательности// Генетика. 1987. Т.23. №7. С.1141-8.
3. Babyak L., Bacher A., Boretsky Y. et al. Overproduction of Riboflavin in yeast. European Patent Application N98107380.2. filed April. 23. 1998. Ref20071.
4. Boretsky Y., Voronovsky A., Liuta-Tehlivets O. et al. Identification of an ARS element and development of a high efficiency transformation system for *Pichia guilliermondii*// Curr. Genet. 1999. Vol. 36. N 4. P. 215–221.
5. Sutcliffe J.G. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322// Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 3737–3741.
6. Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors// Gene. 1985. Vol. 33. P. 103–119.

**INFLUENCE OF ARS-FLANKING SEQUENCES ON STABILITY
OF PICHIA GUILLIERMONDII/ ESCHERICHIA COLI SHUTTLE
PLASMIDS IN THE YEAST CELLS**

**O. Khalimonchuk, A. Petryshyn, Y. Pynyaha, D. Fedorovych, A. Dorosh,
Y. Boretsky**

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine,
Dragomanova st. 14/16, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: okhalimonchuck@yahoo.com*

Pichia guilliermondii ARS – element was subcloned on pUC19 and modified pBR322 vectors as a part of 0,82kb HincII fragment of chromosomal DNA. Several plasmids, based on these newly obtained vectors were constructed. Plasmid stability dependence on length of native ARS-flanking sequences was studied.

Increase of size of ARS carrying sequences rises plasmid stability in 4–6 fold.

Thus, length of native ARS-flanking sequences is important for plasmid stability in *P. guilliermondii* cells.

Keywords: yeast, *Pichia guilliermondii*, ARS flanking sequences, plasmid stability.

Стаття надійшла до редколегії 25.06.2001

Прийнята до друку 06.07.2001