

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АВТОНОМНЫХ И ИНТЕГРИРОВАННЫХ ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ ГЕН ADE2 *Saccharomyces cerevisiae*

П. К. КАШКИН, А. П. ЯНУШКА,  
С. Г. ИНГЕ-ВЕЧТОМОВ

Большинство автономно реплицирующихся векторов для клонирования в дрожжах созданы на основе их эндогенной плазмиды — 2 мкм ДНК [5].

Наличие в векторных плазидах *ori*-сайта 2 мкм ДНК обеспечивает их автономную репликацию и многокопийность [6]. Включение в состав плазмид фрагмента хромосомной ДНК дрожжей, несущего генетический маркер, обуславливает способность таких плазмид встраиваться в хромосомы клетки хозяина по механизму гомологичной рекомбинации [13, 16].

Если в плазмиде при этом присутствует хотя бы один из двух инвертированных повторов 2 мкм ДНК, то после интеграции хромосома, содержащая плазмиду, дестабилизируется. Объяснение этого феномена было предложено американскими и датскими исследователями [12, 15].

Сант-специфическая рекомбинация между интегрированной плазмидой и эндогенной 2 мкм ДНК в области инвертированного повтора [7] приводит к интеграции 2 мкм ДНК в хромосому с высокой частотой.

В результате такой последовательной интеграции плазмиды и 2 мкм ДНК в хромосоме оказываются два инвертированных повтора 2 мкм ДНК и один прямой повтор в составе плазмиды. Затем неравный сайт-специфический обмен между сестринскими хроматидами приводит к образованию ди- и ацентрического фрагмента хромосом, которые могут быть утрачены вследствие расхождения центромер. Для гаплоидной клетки такая утрата части или целей хромосомы летальна, у диплоидов, гетерозиготных по интегрированной плазмиде, такая дестабилизация хромосомы обуславливает проявление рецессивных маркеров гомологичной хромосомы.

Настоящая работа предпринята с целью изучения стабильности автономно реплицирующихся плазмид, содержащих ген ADE 2, и особенностей их интеграции в хромосомы клетки-хозяина.

**Материалы и методы.** В работе использованы штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из Петергофской генетической коллекции: 90-Д201 ( $\alpha$  pheA10 ade2-144-791 his7-1 lys9-A21 leu2-3, 112); 100-Д201 ( $\alpha$  metA1 ade2-144-791 his3 leu2-3, 112); 35В-Д226 ( $\alpha$  metA1 ade2-2001 his4-B26 lys9-A21 leu2-3, 112); 3-П219 ( $\alpha$  adel-14 his7-1 lys2-A12); 4-П219 ( $\alpha$  adel-14 his7-1 lys2-A12); 1-ПГ104 ( $\alpha$  his3-1); 17Б-П2393 ( $\alpha$  his3-1); 2В-П255 ( $\alpha$  adel-6 adeX his4-B26 lys9-A21); 4А-П255 ( $\alpha$  adel-6 adeX his4-B26 lys9-A21); 1-П2118 ( $\alpha$  asp5); 20-П2200 ( $\alpha$  asp5); 2Б-П3663 ( $\alpha$  ade2-163 his7-1 metA1 thr4-B15 leu2-2); 14Б-П315 ( $\alpha$  ade 1-6 his 4 his 6 lys 2-A 38 thr 4-B 15 leu 2-1) Штамм

1-ПГ104 получен из лаборатории И. А. Захарова (Ленинградский институт ядерной физики АН СССР).

Дрожжи выращивали при 30°C на средах SC или YEPD [17]. Трансформацию дрожжей проводили по методу Хиннена [14].

Количественную оценку стабильности трансформантов по признаку Ade<sup>+</sup> или Leu<sup>+</sup> — осуществляли следующим образом: трансформанты дрожжей клонировали в селективных условиях (на среде SC со всеми необходимыми добавками, но без аденина или лейцина). Отдельные колонии трансформантов ресуспендировали в воде и высевали на

богатую среду (YEPD) по 300—400 клеток на чашку. Отношение числа колоний фенотипа Ade<sup>-</sup> или Leu<sup>-</sup> к общему числу проанализированных колоний соответствует частоте потери признака Ade<sup>+</sup> или Leu<sup>+</sup> за одно клеточное деление. При этом считается, что клетки, утратившие плазмиду, в селективных условиях не делятся, но остаются жизнеспособными.

Скрещивание и тетрадный анализ гибридов проводили по стандартной методике [2].

**Результаты экспериментов.** Ранее нами был выделен ген ADE2 *Saccharomyces cerevisiae* в составе Bam HI фрагмента дрожжевого генома размером 8,8 тыс. н. п. в плазмиде YEP ade2-11 (рис. 1) [4].

Плазмиды YEP ade2-11 характеризуются митотической нестабильностью, варьирующей в широких пределах (от 6 до 90%) у различных трансформантов штамма 90-D201.

Морфологическая особенность мутантов дрожжей по локусу ade2 — красный цвет колоний делает плазмиду, несущую ген ADE2, удобной для изучения стабильности трансформантов. Наиболее стабильные трансформанты (стабильность более 80%) образуют на среде YEPD колонии белого цвета, трансформанты, имеющие стабильность от 20 до 50%, образуют в тех же условиях гетерогенные колонии розового цвета, и, наконец, наименее стабильные трансформанты, сохраняющие плазмиду с частотой менее 10%, образуют колонии красного цвета, фенотипически не отличающиеся от колоний Ade<sup>-</sup> рецидивного штамма 90-D201 (a pheA10 lys9-A21 his7-1 leu2-3, 112 ade2-144-791).

На примере одного из таких крайне нестабильных трансформантов A13 мы показали, что стабильность автономно реплицирующейся плазмиды может быть повышена в процессе культивирования в селективных условиях до 30%. Однако наиболее стабильно признак Ade<sup>-</sup> наследуется в результате интеграции плазмиды в хромосому клетки хозяина.

Используя описанные морфологические особенности трансформантов фенотипа Ade<sup>+</sup>, мы отобрали 46 независимых интегрантов, характеризующихся стабильностью более 99%. Тетрадный анализ гибридов, полученных от скрещивания таких стабильных клонов с тестерным штаммом 2Б-П3663 (α ade2-163 his7-1 metA1 thr4-B15 leu2-2), продемонстрировал нормальное расщепление по признакам Ade<sup>-</sup> и Leu<sup>-</sup>.

Все 46 интегрантов были скрещены с двумя тестерными штаммами: 100-D201 (α ade2-144-791 his3 metA1 leu2-3, 112) и 35B-D226 (α ade2-2001 his4-B26 lys9-A21 metA1 leu2-3, 112). Полученные гибриды в отличие от родителей-интегрантов были митотически нестабильны и утрачивали признаки Ade<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup> одновременно с частотой от 10 до 40%, что легко определяется по многочисленным красным колониям в расссе гибридов на среде YEPD. Более того, некоторые диплоиды совместно с признаками Ade<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup> утрачивают признак His<sup>+</sup>. В этом случае стабильный трансформант (интегрант) образует гиб-

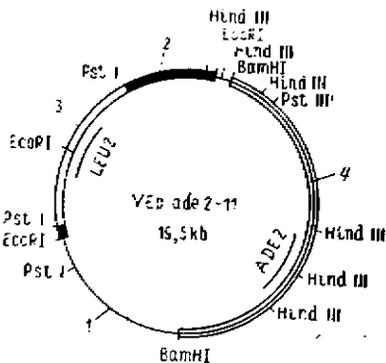


Рис. 1. Схема плазмиды YEP ade2-11.

1 — рВR322; 2 — EcoRI 1 × D<sup>+</sup> фрагмент 2 мкм ДНК; 3 — Pst I фрагмент дрожжевого генома, содержащий ген LEU2; 4 — BamHI фрагмент дрожжевого генома, содержащий ген ADE2.

риды, нестабильные по признакам Ade<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup> с обоими штаммами: 100-Д201 и 35В-Д226, в то время как сегрегацию по признаку His<sup>-</sup> обнаруживает только один из двух гибридов каждого трансформанта: либо со штаммом 100-Д201, либо 35В-Д226 (табл. 1). Мы провели

Таблица 1. Митотическая стабильность гибридов, гетерозиготных по интегрированной плазмиде.

Хромосома, содержащая плазмиду	Число интегрантов	Интегрант × 100-Д201		Интегрант × 35В-Д226	
		Стабильность признаков Ade Leu, % *	Проявление маркера	Стабильность признаков Ade Leu, %	Проявление маркера
III	6	64,1—92,3 (5)	—	72,0—77,3 (2)	his4
XV	36	71,0—89,9 (8)	his3	89,7—96,0 (4)	—
Не обнаружена	4	80,6—92,3 (4)	—	80,3—90,8 (2)	—

\* В скобках указано число гибридов, для которых стабильность определена количественно.

функциональный тест на аллелизм у сегрегантов фенотипа His<sup>-</sup> по отношению к мутациям: his3 (тестеры: 1-ПГ104, 17Б-П2393); his4 (тестеры: 2В-П255, 4А-П255); his7 (тестеры: 3-П219, 4-П219), используя остаточную способность к спариванию диплоидов-интегрантов, гетерозиготных по локусу типа спаривания. Оказалось, что у 36 диплоидов, одним из родителей которых был штамм 100-Д201, выщепляются одновременно мутации: ade2, leu2 и his3 (XV хромосома), а у 6 других диплоидов, одним из родителей которых был штамм 35В-Д226, выщепляются одновременно мутации ade2, leu2 и his4 (III хромосома). Ни в одном случае мы не обнаружили выщепления мутации his7-1 (II хромосома). Гибриды оставшихся 4 трансформантов характеризуются митотической нестабильностью только признаков Ade<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup>, но не His<sup>+</sup> (табл. 1).

В соответствии с данными Фалко и Холмберга [12, 15] наши результаты указывают на то, что у 36 интегрантов произошло включение плазмиды в XV хромосому, у 6 — в III хромосому. Поэтому мы исследовали дестабилизацию этих хромосом по проявлению рецессивных маркеров his3 или his4 (рис. 2).

Область интеграции плазмиды у 4 интегрантов: Тра 13—12, Тра 13—19, Тра 13—39 и Тра 8—4 нам таким образом установить не удалось, так как у соответствующих гибридов не обнаружено одновременно с утратой признаков Ade<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup> проявления каких-либо рецессивных маркеров.

Эти результаты подтверждаются данными тетрадного анализа.

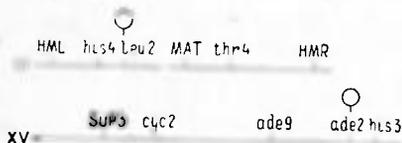


Рис. 2. Упрощенная генетическая карта

III и XV хромосомы дрожжей *S. cerevisiae*. Интеграция плазмиды в III хромосому происходит в область между генами thr4 и HMR, а в XV хромосому — в область между генами ade9 и ade2 his3.

Мы скрестили гаплоид 2Б-П3663 ( $\alpha$  ade2-163 his7-1 metA1 thr4-15 leu2-2) с интегрантом Тра 13—4, предположительно содержащим плазмиду в III хромосоме. Действительно, маркеры Leu<sup>+</sup> и Ade<sup>+</sup> проявляют тесное сцепление между собой и сцеплены с локусом MAT III хромосомы (табл. 2).

При скрещивании того же гаплоида с интегрантом Тра 13—0, предположительно содержащим плазмиду в XV хромосоме, маркеры Leu<sup>-</sup> и Ade<sup>-</sup> также проявляют тесное сцепление между собой, но наследовались независимо от локуса MAT (табл. 2).

Таблица 2. Тетрадный анализ диплоидов, полученных от скрещивания интегрантов Тра 13-4 и Тра 13-0 с тестерным штаммом 2Б-П3663

Пара маркеров	Тип тетрад			$\chi^2$ 1:1:1:4	$P_{\chi^2}$ 1:1:1:4
	P	N	T		
Тра 13-4 × 2Б-П3663					
Leu—Ade	12	0	0		
Leu—MAT	14	2	16	17,04	$P < 0,01$
Lys—MAT	3	2	21	1,99	$0,25 < P < 0,5$
Lys—Leu	6	3	21	0,99	$0,3 < P < 0,75$
Тра 13-0 × 2Б-П3663					
Leu—Ade	31	0	0		
Leu—MAT	5	5	29	0,13	$0,9 < P < 0,95$
Lys—MAT	4	5	19	0,12	$0,9 < P < 0,95$
Lys—Leu	4	3	21	3,2	$0,1 < P < 0,25$

Если интегрант Тра 13-0 действительно содержит плазмиду, включенную в XV хромосому, то мы вправе ожидать тесного сцепления признаков  $Ade^+$  и  $Leu^+$  с мутантной аллелью *ade2-144-791* и отсутствия сцепления с мутантной аллелью *ade2-163* тестерного штамма 2Б-П3663. Тогда все  $Ade^-$  сегреганты гибрида от скрещивания интегранта Тра 13-0 с тестером 2Б-П3663 должны нести аллель *ade2-163*. Используя явление межаллельной комплементации в локусе *ade2*, мы показали, что фенотип 40 проверенных  $Ade^-$  сегрегантов обусловлен аллелью *ade2-163*, а не аллелью *ade2-144-791*, на основании чего можно утверждать, что интегрант Тра 13-0 содержит плазмиду в XV хромосоме.

Тетрадный анализ гибридов, полученных от скрещивания гаплоидного тестерного штамма 2Б-П3663 и интегрантов Тра 13-12, Тра 13-19 и Тра 13-39, нам провести не удалось из-за низкой жизнеспособности спор (менее 3% тетрад с 4 жизнеспособными спорами).

Оценка частоты возникновения рецессивных мутантов, устойчивых к канаванину у интегрантов Тра 13-12, Тра 13-19 и Тра 13-39 (9), а также частоты митотической рекомбинации: центромер II хромосомы — ген *lys2* (3), у гибридов этих интегрантов с тестером, несущим мутацию *lys2*, позволили нам установить, что интегранты, видимо, содержат диплоидный набор хромосом или, по крайней мере, являются дисомиками по V и II хромосомам, несущим маркеры *can<sup>r</sup>* и *lys2*.

Нормальная (80%) жизнеспособность спор гибридов, полученных от скрещивания интегрантов Тра 13-12, Тра 13-19, Тра 13-39 с диплоидным штаммом 54Б-П315, действительно доказывает наличие у интегрантов двойного набора хромосом и позволяет провести тетрадный анализ тетраплоидов.

Расщепление в тетрадах по признаку  $Leu^+$  для всех тетраплоидов (табл. 3) близко к ожидаемому в случае включения плазмиды только в одну из гомологичных хромосом интегранта. В последнем случае все тетрады должны иметь расщепление по признаку  $Leu^+$  в отношении  $2+ : 2-$ .

**Обсуждение.** Дрожжевой ген *ADE2* кодирует структуру фермента фосфорибил-гидрогеназ-карбоксилазы (АИР-карбоксилазы), участвующего в окислении пуринов. Дефект гена *ADE2* приводит к образованию клеток дрожжей-сахаромицетов красного пигмента. Введение интактного гена *ADE2* методом трансформации восстанавливает белую окраску колоний. Возможность визуальной оценки (цвет колоний или штриха трансформанта зависит от его стабильности) позволяет использовать эту систему для изучения стабильности дрож-

Таблица 3. Расщепление по маркерам в тетрадах тетраплоида, полученного от скрещивания автодиплоидных интегрантов Тра 13—12, Тра 13—19, Тра 13—39 с тестерным автодиплоидным штаммом 54Б—П315.\*

Маркер	Проанализировано тетрад	4 <sup>+</sup> :0 <sup>-</sup> 4нк:0к	3 <sup>+</sup> :1 <sup>-</sup> 3нк:1к	2 <sup>+</sup> :2 2нк:2к	1 <sup>+</sup> :3 <sup>-</sup> 1нк:3к	4 <sup>+</sup> :4 <sup>-</sup> 0нк:4к	P
<b>Тра 13—19</b>							
Leu <sup>+</sup> :Leu <sup>-</sup>	23	1	4	21	0	0	0,55 < P < 0,85 0,1 < P < 0,2
Thr <sup>+</sup> :Thr <sup>-</sup>	23	14	5	3	1	0	0,70 < P < 0,75
Phe <sup>+</sup> :Phe <sup>-</sup>	23	10	8	4	1	0	0,99 < P < 1
MATa:MATα	12	6	1	5	0	0	0,1 < P < 0,2
<b>Тра 13—12</b>							
Leu <sup>+</sup> :Leu <sup>-</sup>	29	0	2	22	4	1	0,3 < P < 0,5 0,97 < P < 0,98
Thr <sup>+</sup> :Thr <sup>-</sup>	29	19	7	3	0	0	0,1 < P < 0,2
Phe <sup>+</sup> :Phe <sup>-</sup>	21	7	12	2	0	0	0,05 < P < 0,1
MATa:MATα	14	11	0	2	0	1	0,05 < P < 0,1
<b>Тра 13—39</b>							
Leu <sup>+</sup> :Leu <sup>-</sup>	33	0	2	23	5	3	0,1 < P < 0,2 0,3 < P < 0,5
Thr <sup>+</sup> :Thr <sup>-</sup>	33	15	13	5	0	0	0,8 < P < 0,9
Phe <sup>+</sup> :Phe <sup>-</sup>	32	16	8	8	0	0	0,3 < P < 0,5
MATa:MATα	14	8	0	5	0	1	P = 1
(2a:2α)							

\* нк — некопулирующие сегрегаты, к — копулирующие сегрегаты.

Примечание. В связи с малым количеством проанализированных тетрад результаты обрабатывали статистически как случайную выборку аскоспор. Расщепление сравнивали с теоретически ожидаемыми по критерию  $\chi^2$  для тетраплоида-симплекса по LEU2 (верхняя строка — хромосомный тип расщепления, нижняя строка — хроматидный тип расщепления), для тетраплоида-дуплекса по MAT, THR4 (хромосомный тип расщепления — маркеры сцеплены с центромером), PHE A10 (хроматидный тип расщепления, маркер несцеплен с центромером). В связи с большим количеством полных прототрофов в расщеплении способность к копуляции удалось исследовать не у всех сегрегатов.

живых плазмид, что важно как в плане фундаментальных исследований, так и в решении ряда прикладных проблем.

Сконструированная нами плазида YEp ade2-11 содержит последовательность бактериального вектора pBR322, EcoRI «D» фрагмент 2 мкм ДНК и дрожжевые гены LEU2 и ADE2 (см. рис. 1). Митотическая стабильность трансформантов штамма 90-D201 плазмидой YEp ade2-11 аномально низка — менее 10%. Как правило, плазмиды, несущие ori — сайт 2 мкм ДНК, обладают стабильностью 80—90% [8, 10]. Такой стабильностью, в частности, обладают трансформанты штамма 90—D201 плазмидой YEp13. Морфологические особенности трансформантов плазмидой YEp ade2-11 позволили нам обнаружить явление автостабилизации плазмиды автономно реплицирующейся в дрожжевой клетке. В связи с этим мы склонны считать, что появление трансформантов, характеризующихся стабильностью от 20 до 80% и соответствием розовой или белой окраской колоний, является следствием автостабилизации в селективных условиях «первичных» трансформантов со стабильностью менее 10%. Причина столь низкой стабильности автостабилизировавшихся трансформантов плазмидой YEp ade2-11, видимо, кроется в структуре BamHI фрагмента, содержащего ген ADE2, а пока остается неизвестной.

В высшей степени стабильности плазмиды достигается при ее включении в хромосому клетки. В настоящее время не было обнаружено по белку Leu на дрожжевых клетках автостабилизировавшихся трансформантов. Плазида YEp ade2-11 имеет области гомологии с III (локус leu2) и XV (локус ade2)

хромосомами, поэтому мы ожидали включения плазмиды в III или XV хромосому клетки-хозяина (см. рис. 2).

Обнаруженная Фалко [12] и Холмбергом [15] митотическая нестабильность диплоидов, гетерозиготных по интегрированной плазмиде, уже нашла применение в генетическом картировании у дрожжей [11, 1]. Присутствие в составе плазмиды генетического маркера ADE2 позволило нам еще полнее использовать преимущества метода картирования.

Для идентификации хромосомы, содержащей интегрированную плазмиду, достаточно установить дестабилизированную хромосому интегранта. Если утрата признака Ade<sup>+</sup> у диплоида, гетерозиготного по интегрированной плазмиде (определяемая по цвету колоний сегрегантов), сопровождалась гомозиготизацией маркера his4 — интеграция произошла в III хромосому, если — маркера his3, то — в XV хромосому.

Правомерность такого подхода мы подтвердили с помощью тетрадного анализа трансформантов. Наиболее часто включение плазмиды YEp ade2-11 происходит в XV хромосому (36 случаев). В 6 случаях интеграция произошла в III хромосому. По-видимому, более высокая частота интеграции плазмиды в XV хромосому обусловлена большей протяженностью области гомологии плазмиды YEp ade2-11 с XV хромосомой (8,8 тыс. н. п.), чем с III хромосомой (4,2 тыс. н. п.).

Особенностью плазмиды YEp ade2-11 является то, что она содержит вблизи гена LEU2 повторяющиеся в геноме дрожжей последовательности:  $\delta$ -последовательность и часть Tu1-элемента. В связи с этим мы вправе были ожидать интеграцию плазмиды и в другие хромосомы клетки хозяина по гомологии с  $\delta$ -последовательностью или Tu1-элементом. В последнем случае у анализируемых диплоидов, гетерозиготных по интегрированной плазмиде, не должны были проявляться рецессивные маркеры his4 или his3 III или XV хромосомы. Четыре из исследованных интегрантов действительно образуют при скрещивании с тестерными штаммами 100-D201 и 35B-D226 гибриды, стабильные по признаку His<sup>+</sup> (см. табл. 1). Однако дальнейшее изучение трех из них позволило установить, что интегранты Тра 13—12, Тра 13—19 и Тра 13—39 являются диплоидами. Таким образом, стабильность признака His<sup>-</sup> гибридов, полученных от скрещивания этих интегрантов с гаплоидными тестерами, обусловлена, видимо, тройным набором хромосом гибридов, в котором лишь одна из трех гомологичных хромосом содержит интегрированную плазмиду.

Мы не обнаружили интеграцию плазмиды YEp ade2-11 по гомологии с повторяющимися последовательностями и Tu1, вероятно, в силу небольшого размера  $\delta$ -последовательности и фрагмента Tu1-элемента в составе плазмиды. Возможно, при исследовании большей выборки интегрантов мы смогли бы обнаружить включение плазмиды в другие хромосомы клетки-хозяина.

#### Summary

Mitotic stability of replicating plasmid YEp ade2-11 which contains LEU2 and ADE2 genes of *S. cerevisiae* is less than 10%. Stability of plasmid increased after cultivation transformants (strain 90—D201) under selective conditions. Transformants which contain integrating plasmid YEp ade2-11 are more stable (about 100%). We studied sites of integration of the two-marker (ADE2, LEU2) plasmid basing upon destabilization of chromosomes bearing 2u DNA. More often plasmid YEp ade2-11 integrated into the chromosome XV, where ADE2 located, but sometimes it integrated into the chromosome III, where LEU2 located.

#### УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булат С. А., Захаров И. А., Степанова В. П., Яровой Е. Ф. Использование эффекта дестабилизации хромосом после интеграции в них плазмид для генетического картирования дрожжей. — Докл. АН СССР, 1983, т. 273, № 2, с. 473.

2. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова Н. Б. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1976, с. 112.
3. Карпова Т. С., Горденин Д. А., Андрианова В. М., Инге-Вецтомов С. Г. Генетический экспресс-тест для различения гаплоидов и автодиплоидов у дрожжей-сахаромицетов. Генетика, 1983, т. XIX, № 12, 1934—1940.
4. Кашкин П. К., Янушка А. П., Краснопецева Н. Г., Инге-Вецтомов С. Г. Структурная нестабильность плазмиды, содержащей дрожжевые гены ADE2 и LEU2.— Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1983, № 10, с. 28—33.
5. Broach J. R. The yeast plasmid 2u circle.— In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. I. Life cycle and inheritance / Eds. J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach. New York, 1981, p. 445—470.
6. Broach J. R. Construction of high copy yeast vectors using 2-um circle sequences.— Methods in enzymology, 1983, vol. 101, p. 307—325.
7. Broach J. R., Guarascio V. R., Jayaram M. Recombination within the yeast plasmid 2u circle is site-specific.— Cell, 1982, vol. 29, p. 227—234.
8. Broach J. R., Strathern J. N., Hicks J. B. Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene.— Gene, 1979, vol. 8, p. 121—133.
9. Clarke L., Hsiao C.-L., Carbon J. Selection procedure for isolation of centromere DNAs from *Saccharomyces cerevisiae*.— Methods in enzymology, 1983, vol. 101, p. 300—307.
10. Cohen J. D., Eccleshall T. R., Needleman R. B. *et al.* Functional expression in yeast of the *Escherichia coli* plasmid gene coding for chloramphenicol acetyltransferase.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, vol. 77, p. 1078—1082.
11. Falco S. C., Botstein D. A rapid chromosome-mapping method for cloned fragments of yeast DNA.— Genetics, 1983, vol. 105, p. 857—872.
12. Falco S. C., Li Y., Broach J. R., Botstein D. Genetic properties of chromosomally integrated 2u plasmid DNA in yeast.— Cell, 1982, vol. 29, p. 573—584.
13. Falco S. C., Rose M., Botstein D. Homologous recombination between episomal plasmids and chromosomes in yeast.— Genetics, 1983, vol. 105, p. 843—856.
14. Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R. Transformation of yeast.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, vol. 75, p. 1929—1933.
15. Holmberg S., Nilsson-Tillgren T., Kielland-Brandt M. C., Petersen J. G. L. Chromosome breakage in yeast caused by sister-chromatid recombination in an integrated 2-micron plasmid.— Carlsberg Res. Commun., 1982, vol. 47, p. 355—369.
16. Ilgen C., Farabaugh P. J., Hinnen A., Walsh J. M., Fink G. R. Transformation of yeast.— In: Genetic engineering / Eds. J. K. Setlow, A. Hollaender. New York, 1979, p. 117—132.
17. Sherman F., Fink G. R., Lawrence C. W. Methods in yeast genetics. New York, 1972, p. 55—56.

## ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ — АНАЛОГОВ мРНК

В. В. АНЦИФЕРОВА, А. Г. ВЕНЬЯМИНОВА,  
М. И. РЕПКОВА, Л. А. ФРАНК, В. И. ЯМКОВОЙ

Синтетические олигорибонуклеотиды в настоящее время широко используются в качестве инструментов исследования для решения целого ряда проблем физико-химической биологии. В частности олигорибонуклеотиды, содержащие инициирующий кодон АрUpG на 5'-конце молекулы, нашли применение в качестве моделей мРНК при изучении функциональной топографии рибосом [1, 15, 16].

В данной работе описан препаративный химико-ферментативный синтез двух аналогов мРНК-нонарибонуклеотида АрUpG(pU)<sub>6</sub> и пентадекарбонуклеотида АрUpG(pU)<sub>6</sub>(pA)<sub>5</sub>pAr, основанный на использовании T4 РНК-лигазы для «сшивания» химически синтезированных и полученных ферментативным путем коротких олигорибонуклеотидных блоков.\*

\* Используемые сокращения: ТСХ — тонкослойная хроматография, МКХ — микроколоночная хроматография, MSTet<sub>4</sub> — мезитилсульфотетразолид, Thr — тетрагидропиридин, MeOTf — метокситрифил, >CHOEt<sup>+</sup> — этоксиметилден, ClPh — п-хлорфенил, Tri — 1,2,4-триазол-1-ил, DMAp — 4-диметиламинопиридин, TEAB — триэтил-аммонийбикарбонат.