

УДК 575.13: 575.224: 582.282.23

М.Ю.Левчук (5 курс, каф. ЭФ), Ю.В.Киль, с.н.с. (ПИЯФ РАН),  
Т.Н.Кожина, к.б.н., с.н.с. (ПИЯФ РАН)

## СОЗДАНИЕ БАНКА ГЕНОМНОЙ ДНК И ОТРАБОТКА МЕТОДОВ ТРАНСФОРМАЦИИ ГРИБА *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

Гриб *Aureobasidium pullulans*, относящийся к классу несовершенных грибов, обладает исключительно высокой устойчивостью к летальному действию УФ-лучей и ионизирующей радиации. Эту высокую радиостойчивость предположительно связывают с наличием в клетке мощной репаративной системы, позволяющей ликвидировать двунитевые разрывы в молекуле ДНК. Такой ферментативной системой может быть рекомбинационная система репарации ДНК, достаточно хорошо изученная у других организмов – в частности, у дрожжей-сахаромицетов. Поэтому гриб *A.pullulans* представляет интерес для изучения механизмов репарации и рекомбинации. В связи с этим перед нами была поставлена задача получения у этого гриба коллекции ауксотрофных мутантов и мутантов с повышенной чувствительностью к летальному действию УФ и ионизирующей радиации. Такие мутанты могли иметь нарушения в работе рекомбинационной репарации.

В ходе нашей экспериментальной работы при использовании такого мутагена, как УФ излучение, была получена коллекция ауксотрофов, среди которых были идентифицированы мутанты с потребностью в аргинине, лейцине и метионине. Соответствующие мутации могут быть в дальнейшем использованы, как генетические маркеры исследуемых штаммов. Кроме того, в ходе эксперимента были получены 3 радиочувствительных мутанта, 2 из которых обладали повышенной чувствительностью к летальному действию метилметансульфоната и ионизирующей радиации, а третий, помимо этого, обладал еще исключительно высокой чувствительностью к действию УФ-излучения.

Для изучения структуры и функции генов, затронутых мутациями радиочувствительности, необходимо их клонирование в составе челночных плазмид. Для этого была использована гибридная плазида рЕА6а-hphMX6, содержащая бактериальный ген устойчивости к антибиотику гигромицину под контролем грибного промотора GLA. Этот ген способен экспрессироваться в клетках грибов, однако сама плазида не может автономно реплицироваться в клетках *A. pullulans*. Поэтому для создания банка геномной ДНК гриба *A. pullulans* необходимо включение в состав плазмиды последовательности, которая обеспечивает её автономную репликацию в клетках этого гриба. Предварительная работа с плазмидой проводилась на хорошо генетически изученном объекте – дрожжах *S.cerevisiae*. В результате экспериментов по трансформации кольцевой и линеаризованной формами плазмид было показано, что ген действительно экспрессируется в клетках грибов, обеспечивая устойчивость дрожжевых клеток к гигромицину. При этом эффективность трансформации линеаризованной формой на порядок превышала частоту трансформации в случае использования кольцевой плазмиды, что хорошо согласуется с литературными данными.

Сложность работы с *A. pullulans* заключается в низкой эффективности трансформации, что существенно осложняет проведение экспериментов. На данном этапе работы подобрана концентрация гигромицина, при которой возможен отбор трансформантов, и отработана методика трансформации на основе получения протопластов.

В дальнейшем планируется создание банка геномной ДНК гриба *A. pullulans* с целью изучения генов, контролирующих процессы репарации и рекомбинации.