

<http://yadyra.ru>

Дипломная работа на тему:

Создание вектора, несущего репортерный ген β -глюкуронидазы GUS и оптимизация транзientной экспрессии генно-инженерной конструкции в модельной системе растительных протопластов *Nicotiana tabacum L.*

Введение.

В настоящее время весьма актуальными становятся проблемы загрязнения окружающей среды различными поллютантами, в частности углеводородами нефти (Гафарова, Зарипова, 2005), тяжелыми металлами (Mc Grath, 1994), а также радионуклидами, которые характеризуются длительным периодом полураспада, высоким токсикогенным и канцерогенным эффектом.

В связи с этим стремительно развивается перспективное направление биоаккумуляции поллютантов - фиторемедиация.

Фиторемедиация - это направление биотехнологии, которое, используя аккумулятивные свойства растений, служит локализации (путем извлечения из окружающей среды) и дальнейшей утилизации загрязняющего агента.

В основе лежит предположение о том, что в тканях мезофилла растения возможна экспрессия бактериального гена уранил-редуктазы (ген цитохрома c), который блокирует восстановление урана до нерастворимой формы UO_4 , в связи с чем уран может транспортироваться в надземные органы (зеленые листья), которые легко собирать и складировать, накапливая уран для дальнейшей переработки.

Для утилизации радионуклидов урана из почвы лучше использовать многолетние травы и сидеральные культуры, которые либо имеют сильно развитую листовую пластину, либо дают несколько укосов за летний период. Таким образом можно более интенсивно адсорбировать радионуклиды из почвы.

В качестве таких растений – аккумуляторов целесообразно использовать экологически пластичные сидеральные культуры, такие как горчица, клевер, козлятник выращивание которых возможно в почве любой агроклиматической зоны нашей страны.

Для утилизации радионуклидов урана из воды целесообразно в качестве аккумуляторов использовать растения-гидрофиты, характеризующиеся высоким индексом листовой поверхности и

паренхимной формой хлорофиллоносных клеток листа. Таким растением является кубышка желтая *Nymphaea lutea*, так как она имеет широкий ареал распространения и сильно развитую систему придаточных корней, которые прикрепляются к листовому междоузлию и имеют большую всасывающую поверхность, так что даже после осушения водоема в силу природных процессов это растение будет способно вытягивать радионуклиды урана вместе с почвенным раствором.

Методы создания таких организмов-аккумуляторов основаны на получении трансгенных растений, экспрессирующих соответствующие целевые гены. Эти трансгенные растения представляют собой трансформанты пластома, так как целевой ген цитохромоксидаза 1, с помощью которого осуществляется аккумуляция урана, экспрессирует белок-переносчик электронов в окислительно-восстановительной цепи фотосистемы I, которая локализована в мембранах хлоропластов.

Наиболее высокая частота получения фертильных трансгенных растений обеспечивается трансформацией с помощью агробактерий, несущих соответствующие генно-инженерные конструкции. Этот процесс для модельных растений (табак, арабидопсис) вполне оптимизирован. Главные трудности связаны с разработкой системы экспрессии целевого гена в растении-реципиенте: конструировании оптимального вектора, несущего целевой ген под контролем соответствующего промотора и в присутствии селективных генов, позволяющих качественно и/или количественно определить эффективность экспрессии, и который мог бы достаточно легко встраиваться в геном испытываемого растения.

При создании генно-инженерных конструкций для испытания возможности их экспрессирования обычно используют систему транзientной экспрессии в растительных протопластах или специальные методы инфильтрации в гетерогенные экспланты.

Но удобнее всего для проверки экспрессии конструкции использовать систему протопластов, так как в условиях этой системы экспрессия гена

может быть идентифицирована быстро (в течение суток) по причине отсутствия клеточных стенок, а так же точного и быстрого транспорта конструкции к месту ее транскрипции.

Целью данной работы явилось создание оптимально экспрессирующейся генно-инженерной конструкции, несущей репортерный ген β -глюкуронидазы (GUS-ген) и оценка транзientной экспрессии этого гена в протопластах растений табака *Nicotiana tabacum* сорта Petit Havana.

В связи с данной целью работы были поставлены следующие задачи:

- 1) получение жизнеспособных протопластов табака *Nicotiana tabacum*, сорт Petit Havana;
- 2) создание генно - инженерных конструкций с геном *gus* под контролем 35S и RBC/O промоторов;
- 3) разработка системы клонирования созданных генно-инженерных конструкций;
- 4) подбор условий трансформации протопластов созданными конструкциями;
- 5) оценка транзientной экспрессии гена GUS.

1. Обзор литературы.

1.1. Конструирование вектора.

Создаваемый вектор должен обеспечивать стабильное наследование рекомбинантной ДНК в автономном состоянии, иметь вспомогательные элементы, облегчающие генно-инженерные процедуры, например, содержать маркер, инактивирующийся при встраивании чужеродной ДНК или содержать специфические сайты, облегчающие встраивание чужеродных последовательностей в геном растения.

Для целей фиторемедиации солей урана из почвы наиболее предпочтительными являются растения с трансформацией хлоропластного генома растений. Ранее Коор с сотр. (Коор et al., 1995) была разработана векторная система для пластомной трансформации растений *Nicotiana tabacum* на основе вектора, содержащего химерный ген, несущий *aadA* кодирующую область *E.coli*, промотор 16S рДНК, соединенный с синтезированным рибосом-связывающим сайтом, который представляет собой последовательность длиной 500 н.п. и включает 3'-ОН UTR-область гена *gbcL* (большая субъединица гена рибулезобифосфаткарбоксылазы-оксигеназы), а также фрагменты пластома табака длиной 3.75 kb на 5'-конце и 0.95kb на 3'-конце. Эти дополнения позволяют помещать чужеродные последовательности между генами *rpl 32* и *trnL* пластома табака. Таким образом, данный вектор переносил чужеродные последовательности в небольшие однокопийные области пластома, которые мало изменялись при трансформации, а уровень экспрессии при этом не снижался

Часто в состав вектора для клонирования входит транскрибируемый энхансер в сочетании с сильным конститутивным промотором, что обеспечивает более точный контроль в процессе клонирования (Lincoln et al., 1998).

Hellens с сотрудниками (Hellens et al., 2005) сконструировали бинарный клонирующий вектор, специально предназначенный для регистрации транзientной экспрессии в растительных клетках. Этот вектор нес ген, экспрессия которого влияла на посттранскрипционные модификации, вследствие чего блокировался сайленсинг РНК и транслировался белок.

Также была создана целая серия векторов рJL, один из которых (рJLA) описал Schauder и др., (Schauder et al., 1987). Этот вектор позволял транслироваться аутентичному кодону АТG гена цитохрома с1, выделенного из картофеля, что приводило к стабильной транзientной экспрессии (Braun et al., 1991).

Удалось получить стабильную экспрессию (76%) и на новом векторе рJLX того же семейства, созданного коллективом Lincoln (1998). Созданный вектор рJLX имел длину 7100 н.п. и нес фрагмент плазмиды рUC 18, где находился маркерный ген устойчивости к ампициллину, ген *gus* под контролем промотора 35S CaMV (вируса мозаики цветной капусты) и pos-терминатора и ген интереса. На первом этапе этой работы вследствие вырезания полилинкера по сайтам рестрикции EcoRI и Hind III из плазмиды рUC 18 и лигирования его с синтетическим полилинкером был получен вектор рUC SP. Далее плазида рUC SP была разрезана рестриктазой Pst I и сшита лигазой с фрагментом 35S CaMV-GUS из конструкции рRTL 2 – GUS с получением рUC GUS. На следующем этапе конструировали вектор рJLNT, для чего рUC GUS резали по сайтам Nde I и Xho I и лигировали с 34S FMV промотором и полилинкером, фланкируемым 5'-сайтом Sma I и 3'- сайтом Sac I. Затем в полученный вектор вставили транслирующий энхансер, который облегчал контроль экспрессии гена интереса, и, таким образом, получили вектор рJLX.

Так же используются кассеты генов, если необходимо получить экспрессию двух и более генов, например, Коор с коллегами сконструировал кассету, состоящую из гена аминокликозид-3'-аденилтрансферазы из *E.coli* под контролем промотора *atrA*, который фланкировал ген с 5'-конца и 3'-

терминатора гена *rbcl* пластидной ДНК *Chlamidomonas reinhardtii* и гена β -глюкуронидазы GUS.

1.2. Выбор оптимального промотора.

Для стабильной экспрессии важно правильно подобрать промотор кодирующей части гена интереса.

Промотор - это 5'-участок гена, отвечающий за инициацию транскрипции путем связывания РНК-полимеразы в ТАТААТ-боксе (положение -10).

Чтобы усилить экспрессию, используют конститутивные промоторы. Timmermans с сотрудниками (1994), а позже Scholthof (1996) ставили под контроль промотора 35S CaMV гены белка капсида CP и протеина 1 P1 ВМЦК и независимо друг от друга получили высокую экспрессию этих генов. Конститутивный 35S промотор ВМЦК 35S CaMV широко применяется в манипуляциях по молекулярному клонированию.

Однако были попытки использовать и альтернативные промоторы, в частности, 34S FMV промотор вируса мозаики норичника шишковатого *Scrophularia nodosa*, который был изучен Sanger и Daubert (1990). В опытах по трансформации протопластов, выделенных из семядольных эксплантов томата *Lycopersicon esculentum* (Lincoln и др. 1998), этот промотор был поставлен перед полилинкером и индуцировал экспрессию гена дифтерийного токсина *dtx*, что привело к отсутствию экспрессии репортерного гена *gus*, лишив возможности оценки уровня экспрессии гена интереса. В связи с этим нельзя сделать вывод о возможности использования этого промотора для оценки экспрессии.

Активность промотора зависит также от его размера. Так, Dominguez (2006) показал, что промотор LEPME длиной 2.7 kb не давал никакого эффекта, а длиной 0.8 kb - показал средний результат при гистохимическом окрашивании цветков табака (окрашивались (только края лепестков),

наилучший результат был получен при длине промотора 0.4kb (окрашивался весь лепесток).

В экспериментах Abumhadi с сотрудниками, (2005) при трансформации эмбриональных клеток ячменя была дана оценка эффективности трех разных промоторов: классического 35S CaMV, промотора гена полиубиквитина кукурузы Ubi1 и промотора гена актина1 из риса Act1. 35S CaMV промотор показал самый низкий уровень экспрессии по сравнению с двумя другими. При этом самая высокая экспрессия была получена с промотора Ubi1, из чего можно заключить, что данный промотор является более специфичным для ячменя, так как получен из злака. Промоторы гена actin 1 и Ubi1 были использованы в конструировании векторов pMRC 1301 и pGEM, соответственно, при трансформации протопластов банана генами gusA и gfp (Sreeramanan et al., 2005), в результате эффективность транзientной экспрессии достигла 90%.

В 2001 году Rita Viaplana, David S.Turner и Simon N.Covey, изучая транзientную экспрессию гена gus под контролем промотора 35S CaMV, нашли в геноме диких форм ВМЦК два аналоговых промотора, на которых возможно изучать транзientную экспрессию, так как на их основе можно получить реплицирующийся вектор, экспрессия которого более интенсивна.

В некоторых случаях гены ставят под контроль одного промотора, что не снижает его эффективности. Так, в работе Quecini, Vieira (Quecini, Vieira, 2001) репортерный ген gus находился рядом с бактериальным геном uidA, и оба гена контролировал один и тот же промотор 35S CaMV. При этом активность гена gus была достаточно высокой.

Важную роль при работе генно-инженерной конструкции играет терминатор, который ограничивает экспрессию гена во времени, ингибируя элонгацию комплементарной цепи ДНК. Терминаторы ставят, используя или последовательности одного и того же гена, из которого выделен промотор, или промотор и терминатор могут быть взяты от различных генов.

В 2005 году Wong Wei Chee, Mahanom Jalil, Meilina Ong Abdullah и др., трансформировали протопласты, выделенные из эмбрионов банана, вектором, в котором маркерный ген гигромицинофосфотрансферазы *hpt* был фланкирован 35S промотором и 35S терминатором, а ген *gus* находился под 35S промотором и *nos* терминатором, и клонировав его в плазмиду pCAMBIA 1301, получили высокую активность гена *gus*.

1.3. Клонирование вектора в клетках *E.coli* .

Клонирование – это процесс размножения вектора, несущего данную конструкцию в специально подготовленной бактериальной клетке. Перед клонированием осуществляется трансфекция клеток *E.coli*, то есть перенос генно-инженерной конструкции из системы *in vitro* в бактериальную систему, что возможно вследствие электропорации или индукции теплового шока (Маниатис и др., 1982)

Электропорация – это процесс быстрого воздействия пиковых значений электрического тока на плазмалемму бактериальной клетки, в результате чего мембраны деформируются, и конструкция проникает внутрь клетки. Индукция теплового шока заключается в резкой смене температур от +4 до +42⁰С в бактериальной культуре в присутствии ионов Ca²⁺, что также приводит к деформации плазмалеммы и проникновению конструкции внутрь клетки.

Первоначально для клонирования использовали бактериальный штамм *E.coli* K12 (Маниатис, Фрич, Сэмбрук, 1982), сейчас популярен штамм DH5α (Hanahan, 1983; Маниатис, 1989). Клонирование нужного фрагмента ДНК проводят в векторах для клонирования.

Для того чтобы из плазмиды создать оптимальный вектор для клонирования, необходимо учесть ряд требований:

1. конструкция должна нести селективный маркер (или несколько маркеров), что дает возможность легко идентифицировать клоны трансформантов и селективно поддерживать плазмиду в популяции бактериальных клеток;
2. конструкция должна содержать полилинкер (множественный сайт рестрикции);
3. конструкция должна быть относительно небольшой и желательно иметь ослабленный контроль репликации, что приводит к многокопийности исследуемого фрагмента ДНК в геноме, упрощает процедуру выделения ДНК и позволяет иметь высокую дозу клонированного гена;
4. конструкция должна стабильно поддерживаться в клетках-реципиентах.

Отбирают клоны двумя способами: 1) негативным отбором (нетрансфецированные клетки, в которых нет вектора, погибают), 2) при помощи изопропилтиогалактопиранозида, в случае, если клонированный ген находится под контролем системы *lac*-репрессор-*lac*- промотор (белоголубая селекция).

На способность клеток *E. coli* к трансформации влияет правильность сборки генно-инженерной конструкции. Если конструкция собрана каким-то несоответствующим образом, то трансформация может не пройти. Например, в работе Lincoln, Bostock дублированный 35S CaMV промотор блокировал трансформацию клеток *E. coli* (Lincoln, Bostock, 1998).

1.4. Транзиентная экспрессия генно-инженерных конструкций.

Транзиентная экспрессия - это внеядерная экспрессия гена, которая детектируется в хлоропластах и митохондриях и не сохраняется в ряду поколений.

Транзиентная экспрессия гена позволяет провести сравнительный анализ цис-активных регуляторных последовательностей и оценить их роль в контроле транскрипции генов клеточного ответа на различные гормональные и средовые факторы.

Оценка транзientной экспрессии удобна в контроле встраивания гена в клетки растения, так как быстро и надежно показывает потенциальную возможность встраивания, уровень экспрессии гена и технологичность созданной конструкции.

Для качественной оценки эффективности транзientной экспрессии технически удобно трансформировать выделенные из растительной ткани протопласты. Протопласты могут быть выделены из любой ткани растения, которую можно подвергнуть воздействию мацерирующих и целлюлитических ферментов, растворенных в каком-либо осмотике.

Первые эксперименты по выделению протопластов были проведены с клетками мезофилла листа табака (*Nicotiana tabacum* L.) были проведены в 1971 году Nagata и Takebe, которые в дальнейшем получили из протопластов растения-регенеранты (Nagata, Takebe, 1971).

Позже, в 1995 году, Кооп с сотрудниками (Кооп et al., 1995) усовершенствовал технологию выделения протопластов из мезофилла листа табака *Nicotiana tabacum* L., учитывая предыдущие работы иностранных коллег, проведенные по изучению роли ферментов в отделении протопласта от клеточной стенки.

Введение ДНК в растительные протопласты является быстрым методом анализа транзientной экспрессии и надежным контролем стабильности трансформации растений в следующих поколениях.

Генетическая трансформация протопластов методом электропорации оптимизирована для многих видов растений, таких как *Brassica napus* (Guerche и др., 1987), *Zea mays* (Rhodes, 1988) и *Oryza sativa* (Shimamoto et al, 1989).

Электрические импульсы изменяют трансмембранный потенциал, что приводит к деформации мембранных пор вследствие повышения дипольного момента на гидрофильной части липидов (Neumann et al., 1982; Kinosita и Tsong, 1977).

В некоторых случаях трансформацию с помощью электрического поля проводили на интактных клетках тканей различных растений. Хотя механизм действия электрического поля на клеточные стенки растений полностью не изучен, экспрессия трансгена наблюдалась в эмбриональных клетках одного *Galega orientalis* (Collen и Jarl, 1999), интактных клетках кукурузы (Songstad et al., 1993, Sabri et al., 1996), бобов овощных и некоторых бобовых трав (Akella, Lurquin, 1993, Dillen et al., 1995), риса и пшеницы (Dekeyser et al., 1990; Xu и Li, 1994), люцерны (Senaratna et al., 1991) и сахарной свеклы (Lindsey, Jones, 1987).

Электропорации подвергали протопласты выделенные из различного растительного материала: гипокотилей, семядольных и листовых эксплантов. Для оптимизации процесса электропорации необходимо соблюдать следующие факторы: 1. напряженность электрического поля 250 В/см; 2. оптимальное число протопластов; 3. использование специальных буферных растворов для электропорации (Tada et al., 1990; Walbot, 1993).

Quesini с сотрудниками в 2001 году при трансформации протопластов банана использовала подобранные коллективом Tada буферные растворы, и получила транзистентную экспрессию на уровне 55%.

Кроме электропорации существует большое количество методов введения ДНК в протопласты, но самый распространенный - это перенос ДНК в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Этим методом можно получить большие популяции с высокой способностью к клеточному делению (Negrutiu et al., 1987; Potrykus, 1991), он предусматривает использование недорогого оборудования и может быть приспособлен к работе с протопластами, выделенными из любых растительных тканей.

Chalfie, Tu, Euskirchen et al. (1994) и одновременно с ними Heim, Prasher и Tsien (Heim et al., 1994) выделяли протопласты для трансформации из листовых эксплантов и корней растений *Arabidopsis thaliana*.

Низкая автофлуоресценция корневых протопластов имеет важное значение, когда визуализируют экспрессию флуоресцирующих репортерных белков, таких как GFP или люциферазы.

В 1999 году Mathur и Koncz разработали высоко технологичный метод трансформации протопластов, выделенных из ткани мезофилла листьев и корня *Arabidopsis thaliana*, позволивший получать большое число трансформированных протопластов. В отличие от других исследователей, выделявших протопласты при комнатной температуре авторы инкубировали суспензию протопластов на льду в течение 35 минут, а затем после центрифугирования и ресуспендирования протопластов медленно добавляли 25-35 μg плазмидной ДНК, растворенной в воде. Через 24-48 часов оценивали транзientную экспрессию генов *gus* и *gfp*.

В экспериментах по трансформации Кооп с коллегами (Кооп et al., 1995) повысил дозу плазмидной ДНК до 50 μg и нашел, что изменение дозы вводимой ДНК не является определяющим фактором в повышении уровня экспрессии.

В процессе постановки опытов авторы также обнаружили, что процедура приготовления и хранения ПЭГ очень сильно влияет на различия в уровне экспрессии. Раствор ПЭГ нельзя автоклавировать и нагревать, а хранить его следует при -20°C . При правильном приготовлении ПЭГ руководствуются максимальной его концентрацией 20% и присутствием Ca^{2+} в концентрации 10-100мМ.

На эффективность транзientной экспрессии оказывают большое влияние такие факторы, как тип экспланта, конформация ДНК, характер предобработки осмопротекторами.

Например в экспериментах Quesini с сотрудниками (2001) выявила, что ген *gus* дает высокий уровень транзientной экспрессии независимо от типа используемого буфера, формы ДНК, осмотической предобработки, характера действия электрического поля на протопластах, выделенных из

семядольных эксплантов по сравнению с протопластами гипокотильного происхождения.

Songstad (Songstad et al, 1993), показал низкий уровень экспрессии в протопластах из листовых эксплантов кукурузы, трансформированных методом электропорации.

Высокая экспрессия гена *gus* была выявлена в протопластах, выделенных из тканей бобовых (Dillen et al., 1995) и риса (Dekeyser et al., 1990) подвергнутых электропорации.

На встраивание фрагмента в геном реципиента существенно влияет конформация молекулы ДНК. Легче всех других форм в геном реципиента встраивается линейная ДНК, что было показано для протопластов из тканей табака (Svab, Maliga, 1993) и бобовых (Akella et al., 1993; Lin et al., 1997)).

Высокая способность к трансформации для линейаризованных плазмидных ДНК была обнаружена на бактериях (Rittich et al., 1996), дрожжах и грибах (Kwon-Chung et al., 1998), интактных клетках (Lin et al., 1997, Sabri et al., 1996, Saunders et al., 1995).

Armaleo с сотрудниками (Armaleo et al., 1990) и Shark (Shark et al., 1991) году доказали, что применение осмотической предобработки культуры клеток существенно повышает эффект трансформации микроорганизмов, что также подтвердилось и на растительных клетках (Russel et al., 1992, Vain et al., 1993).

Экспрессия гена *gus* надежно детектируется методом, разработанным Jefferson (1987). Трансформированные клетки два дня инкубируют в темноте при температуре $24 \pm 1^{\circ}$, после чего их переносят в гистохимический реагент, состоящий из 0.1М фосфатного буфера, 0.5М феррицианида, 0.5 мМ ферроцианида, 0.1% тритон X-100, 10.0мМ EDTA, 20% метанола и 1.0 мМ 5-бром-3-индолил-глюкуронида (X-gluc) (Clontech).

Пробы инкубируют в гистохимическом реагенте 18-24 часа при температуре 37°C . После этого пробы отмывают в 70% этаноле и фиксируют

в растворе FAA (45% абсолютный этанол, 5% ледяная уксусная кислота, 5% формальдегид).

Приготовленные пробы анализируют на фазово-контрастном световом микроскопе. Экспрессия гена *gus* оценивается визуально по интенсивности окрашивания ткани или клеток в синий цвет.

Флуориметрический анализ экспрессии гена *gus* основан на свойстве белка β -глюкуронидазы гидролизоваться субстратом 4- метилумбеллиферил-D- глюкуронидом (MUG), как описано Jefferson (1987).

Концентрация белка в каждой пробе определяется на спектрофотометре при длине волны 595 нм.

Уровни экспрессии гена *gus* на различном материале сильно отличаются. Так Wong Wee Chee с сотрудниками (2005) при трансформации протопластов из эмбриональных клеток банана получили экспрессию гена *gus* 103.9%.

В 2001 году Quesini с коллегами показала различия эффективности экспрессии гена *gus* при трансформации протопластов, выделенных из разных частей растения *Stylosanthes guianensis*: в случае трансформации протопластов, выделенных из семядольных эксплантов, экспрессия гена составляла приблизительно 50%, как и в случае трансформации протопластов, выделенных из листа, но при работе с протопластами, выделенными из гипокотилей, экспрессия снижалась приблизительно до 30%.

Ген зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*) широко используется в качестве репортерного при трансформации растительных и животных тканей. Белок GFP, выделенный из медузы *Aequorea victoria* (Shimomura, Johanson, 1962), состоит из 238 аминокислот (23kDa) и представляет собой 11 β -цепей, переплетающихся с одной α -спиралью, в районе этого переплета и находится флуоресцентный центр, который дает основной пик при длине волны 395 нм. и одиночный пик при длине волны 475 нм. Впервые белок GFP был

использован как репортерный в экспериментах Chalfie с сотрудниками, (Chalfie et al., 1994) на модельных объектах *C.elegans* и *E.coli*.

Получить стабильную ядерную экспрессию GFP было проблематично до тех пор, пока не вырезали интрон, который блокировал экспрессию кодирующей последовательности (Haseloff et al., 1997). С тех пор GFP стал широко применяться в растениях как репортерный ген (Blackman et al., 1998, Köhler et al., 1997).

GFP удобно использовать при регистрации транзientной экспрессии в хлоропластах (Piechulla et al., 1985 Deng и Gruissem, 1988, Hibberd et al., 1998) и митохондриях (Long et al., 1996, Pineau et al., 2005, Braun et al., 1991).

Так, Sreeramanan с сотрудниками (Sreeramanan et al., 2005) в экспериментах по трансформации бананов достиг уровня экспрессии гена *gfp* в культуре протопластов, выделенных из одиночных почек, приблизительно 72% и на протопластах из клеток клубнелуковиц- 28%.

Успехи достигнуты и в экспериментах по трансформации митохондрий однокопийным геном *nad 7*, который кодирует NAD7 субъединицу дыхательного комплекса 1 длиной 72 kb (NADH-убихинон оксидоредуктазу).

В своем исследовании ЦМС-мутантов растений табака *Nicotiana sylvestris* (Pineau et al., 2005) авторы показали возможность встраивания кДНК последовательности гена *nad7* под контролем 35S CaMV промотора в митохондриальную ДНК, что находило свое выражение в изменении физиологических и фенотипических реакций мутантных трансгенных растений.

Эти реакции, вероятно, связаны с отсутствием дыхательного комплекса 1 в нетрансгенных митохондриях и его наличием в составе гена *nad7* в трансформированных этим геном митохондриях.

При переносе гена в матрикс митохондрии, для получения транзientной экспрессии, необходимо наличие небольшого сигнального пептида, который, связываясь с протаскиваемой через мембраны ДНК, изменяет ее конформацию, и ДНК оказывается в матриксе.

Коллектив Pineau выбрал для переноса гена *nad7* в качестве сигнального пептида подвижную дегидрогеназу, которая легко разрезалась бы митохондриальными пептидазами после того как встраиваемая ДНК локализовалась в митохондриальном матриксе.

Белок-предшественник образовывал в цитозоле транслокационный комплекс, который, проходя через мембраны митохондрий, не изменял своей структуры, поэтому для того, чтобы этот пептид стал хорошим транспортером ДНК-фрагмента, авторы навесили на этот цитозольный белковый комплекс аминокислоту гистидин His в 70 и 71 положении, что привело к изменению конформации комплекса при прохождении его через митохондриальную мембрану за счет таутомеризации фосфатных групп гистидина. NAD7 субъединица, связанная своим ДНК-доменом с транспортируемым фрагментом ДНК, а белок – доменами с транслокационным комплексом, подтягивала молекулу ДНК к белковому комплексу и при достижении транслокационным комплексом внутренней мембраны отрывалась от ДНК, которая немедленно соединялась с сигнальным пептидом, протаскивающим ее в матрикс.

Еще в 1991 году Braun и др. [Braun et al., 1991] показали, что белок, кодируемый геном цитохрома C1 из картофеля *Solanum tuberosum* является хорошим кандидатом на роль транспортера ДНК в межмембранное пространство митохондрий.

Цитохром C1 входит в состав комплекса III (убихинон/ цитохром с оксидоредуктазой), который участвует в митохондриальном транспорте электронов, катализируя убихинон – зависимое восстановление цитохрома с одновременным переносом протона через митохондриальное пространство. Цитохром C1 является конечным акцептором электронов и передатчиком их с участием цитохрома с на цитохромоксидазный комплекс.

В грибах и млекопитающих все субъединицы комплекса III, включая и цитохром b, имеют ядерный контроль и синтезируются на цитоплазматических рибосомах, а затем импортируются в митохондрии.

Длинные аминотерминальные последовательности способствуют встраиванию цитохрома С1 в межмембранное пространство митохондрий. Белок цитохром С1 включает в себя два домена, которые играют ведущую роль в изменении его конформации при прохождении через митохондриальные мембраны: гидрофильный домен, направляющий белок в матрикс и гидрофобный «интрамитохондриальный домен», закрепляющий белок на внешней мембране митохондрий.

Любая замена в NH₂- терминальном регионе, например Met₁→Arg₅₆ и в регионе, фланкирующем С-терминальную часть, например, Lys₂₈₀→Arg₂₈₆ и Lys₃₀₂→Arg₃₁₃ приводила к изменению конформации белка и его задержке мембранными митохондриальными белками (Braun et al., 1991).

На перенос эукариотических генов в хлоропласты и митохондрии и их экспрессию в этих органеллах оказывает прямое влияние альтернативный сплайсинг.

Альтернативный сплайсинг - это процесс вырезания интронов (участки гена, которые не кодируют белок) и сшивания экзонов (участки гена, кодирующие белок). В следствие альтернативного сплайсинга имеет место такое явление, как перенос экзонов в пределах одного гена и межгенный перенос.

Есть примеры межгенного переноса экзонов в генах позвоночных животных. В растениях изучение явления переноса экзонов основывается на анализе границ интронов (Long et.al, 1995).

Перенос экзонов - это механизм молекулярной эволюции, который ведет к созданию новых генов с новыми функциями в результате комбинации экзонов из совершенно разных групп генов.

Перенос экзонов в древних генах или в консервативных регионах – это гены или последовательности, гомологичные между разными эукариотическими и прокариотическими видами - заключается в проведении статистического анализа локализации границ интронов.

Многие гены белков органелл имеют ядерный контроль, но белки синтезируются в геномах этих органелл.

Long с сотрудниками (Long et al., 1996) изучали перенос экзонов гена цитохрома C1 и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы GAPDH и выявили донорно-реципиентные взаимоотношения между процессом переноса экзонов и добавлением к N- концу гена цитохрома C1 трех экзонов, что способствовало адаптации этого гена к воздействию белков митохондрий и упрощало протаскивание гена в матрикс митохондрий.

При переносе гена в хлоропласты проблема протаскивания его через межмембранное пространство не стоит так остро, потому что большинство генов пластома имеют двойной ядерно-хлоропластный контроль, чего не наблюдается для генов хондрома (генома митохондрий).

Однако желательно регистрировать транзистентную экспрессию репортерных генов в различных частях клетки, например, в хлоропластах и митохондриях, в связи с чем необходимо получить более полное представление о взаимодействии ядерного генома и геномов хлоропластов и митохондрий.

1.5. Выводы по обзору литературы.

- Исходя из обзора литературных данных, можно сделать вывод, что актуальная проблема фиторемедиации радиоактивного урана на данный момент остается не решенной, поэтому данная экспериментальная работа является целесообразной.
- Многими исследователями разработаны технологичные векторы для клонирования и экспрессии, которые можно напрямую использовать в экспериментах или на их основе конструировать более удобную в конкретном случае векторную систему.

- Анализ экспериментальных работ различных авторов показывает, что выбирать следует, прежде всего, конститутивный промотор, чтобы получить стабильную экспрессию гена во всей растительной ткани.
- Для трансформации протопластов желательно использовать методику введения ДНК, обработанной ПЭГ, так как она оптимизирована и дает высокий эффект встраивания ДНК в протопласты.
- Для повышения эффективности трансформации желательно пользоваться осмотически активными веществами: сахароза, маннитол.
- Транзientную экспрессию маркерного гена *gus*, по возможности, лучше оценивать сначала гистохимическим окрашиванием с X-gluc, а затем проверять флуориметрически при взаимодействии с субстратом 4-MUG.
- Для импорта гена GFP в межмембранное пространство митохондрий необходимо подобрать сигнальный пептид - транспортер и использовать явление межгенного переноса экзонов.

2. Материалы и методы исследования.

2.1. Объект исследования.

Экспериментальную работу проводили на растениях табака *Nicotiana tabacum*, сорт Petit Havana.

Растение *Nicotiana tabacum* является модельным объектом в экспериментах по генной инженерии, так как обладает следующими особенностями:

1. имеет высокую способность к регенерации;
2. переносит любые изменения гормонального статуса, что важно при изучении влияния соотношения цитокининов и ауксинов на эффективность регенерации культур;
3. стабильно культивируется в лабораторных условиях, на питательных средах, и в закрытой стеклянной теплице;
4. дает достаточное количество ткани мезофилла листа, чем достигается требуемая норма выделяемой нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК);
5. удобен для разработки новых методов гистологического анализа;
6. удобен для разработки экспресс-методов оценки работы встраивания генов;
7. удобен для создания модели работы генно-инженерной конструкции с учетом переноса этой модели в условия функционирования генов интереса в целевых растениях.

2.2. Методы исследования.

2.2.1. Культивирование растений табака *Nicotiana tabacum* L.

2.2.1.1. Посев семян табака на питательную среду.

Семена табака *Nicotiana tabacum*, сорт Petit Havana, отбирали от растений, выращенных в теплице, и наносили на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой, а затем стерилизовали 1 минуту в 70% растворе этанола и 5 минут в 20% растворе гипохлорита натрия, после чего семена осторожно пять-шесть раз промывали дистиллированной автоклавированной водой (2 атм в течение 1 часа).

Стерильные семена высевали в чашки Петри, на среду для семян (Таблица 1) и помещали в климокамеру в условия 16-часового светового дня и температуры 22-25°C .

Через 10-14 дней проростки отделяли друг от друга и пересаживали по отдельности в пробирки, далее осуществляли несколько пересадок на свежую среду, после чего сформировавшиеся растения переносили в пластиковые сосуды, где их можно достаточно долго поддерживать и размножать путем черенкования.

2.2.1.2. Черенкование растений табака *Nicotiana tabacum*.

Черенкование и отделение листовых пластин для выделения протопластов осуществляли в ламинар-боксе (стерилизация УФ- светом в течение 20 мин.), используя стерильные скальпели, пинцеты и подложки из плотной бумаги (стерилизация в термошкафу при температуре 120⁰С).

Черенковали растения табака, делая срез в зоне меристем на сегментах стебля, после чего части стебля с листом переносили на свежую питательную среду для черенкования (Таблица 1).

Для выделения протопластов отбирали сформированные, богатые хлорофиллом, без видимых повреждений, крупные листовые пластины с ярко выраженным жилкованием 2-3 яруса сверху.

Таблица 1. Состав сред, использованных для культивирования растений табака *Nicotiana tabacum* в условиях *in vitro* (на 1 л)

Тип среды	Макро MS, мл.	Микро MS, мл.	Сахароза, г.	CaCl ₂ 20%, мл.	Fe-хелат, мл.	Агар, г.
Для семян	25	0.5	5.0			7.0
Для черенкования	25	0.5	10	3.3	5.0	7.0
рН среды	5.6 – 5.8					

Таблица 2. Состав макросолей по Мурасиге-Скуг, 1962 на 1л.

Компонент среды	Концентрация, г/л.
NH ₄ NO ₃	33.0
KNO ₃	38.0
MgSO ₄ x 7H ₂ O	7.4
KH ₂ PO ₄	3.4

Таблица 3. Состав микросолей по Мурасиге-Скуг, 1962 на 1л.

Компонент среды	Концентрация, г/л.
MnSO ₄ x 5 H ₂ O	14.3
H ₃ BO ₃	3.0
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2.0
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	250.0
CuSO ₄ x 5H ₂ O	25.0
CaCl ₂ x 6H ₂ O	25.0
KI	750.0

2.2.2. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli*.

Большинство методов выделения плазмид основано на том, что бактериальные плазмиды находятся в ковалентно замкнутой форме и что они невелики по сравнению с геномной ДНК.

Поскольку выделение направлено на сохранение ковалентно замкнутой формы молекул, необходимо предотвратить действие на них нуклеаз. Для этого в среду для выделения добавляют ЭДТА, который образует хелатные комплексы с ионами металлов и таким образом ингибирует катион-зависимые нуклеазы.

Первый этап многих методов выделения плазмид из грамотрицательных бактерий состоит в лизисе клеток путем обработки их ЭДТА и лизоцимом, разрушающей клеточную стенку. Под действием ЭДТА разрушается наружная мембрана, затем лизоцим расщепляет прочный мукопептидный слой, и в результате образуются сферопласты.

Реакцию проводят при достаточно высокой концентрации сахарозы или другого неионного осмотика, чтобы предотвратить немедленный осмотический лизис сферопластов.

Затем сферопласты, суспендированные в изоосмотическом растворе, лизируют путем добавления детергента. На этом этапе клеточный осадок и фрагменты бактериальной хромосомы можно удалить центрифугированием (происходит осветление лизата).

Особенно удобны два метода выделения плазмид, основанные на том, что они находятся в ковалентно замкнутой форме: центрифугирование в градиенте плотности в присутствии интеркалирующего красителя и щелочная экстракция.

Центрифугирование в градиенте плотности с красителем первоначально использовали для выделения вирусных и митохондриальных нуклеиновых кислот. Иногда плазида имеет существенно другое GC-содержание, чем геномная ДНК бактерии-хозяина. Однако в большинстве случаев GC-содержание плазмидной ДНК мало отличается от GC-содержания геномной ДНК бактерии-хозяина, и эти два типа молекул не удается разделить равновесным центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. Хотя, можно использовать тот факт, что плазмидная ДНК находится в ковалентно замкнутой форме, и при добавлении интеркалирующего красителя бромистого этидия возникает существенное различие в плавучей плотности плазмидной и геномной ДНК.

Когда бромистый этидий связывается с ДНК, он встраивается между плоскостями азотистых оснований и приводит к раскручиванию двойной

спирали: длина молекулы ДНК увеличивается, а ее плавающая плотность уменьшается.

При раскручивании ковалентно замкнутых плазмидных молекул под действием бромистого этидия в ней появляются витки противоположного знака, которые компенсируют друг друга, и бромистый этидий прекращает связываться.

В градиенте хлористого цезия, содержащего бромистый этидий и отцентрифугированного до равновесия, плазмидная ДНК имеют большую плавающую плотность, чем геномная ДНК и поэтому концентрируется в виде полосы, расположенной ниже полосы геномной ДНК. При центрифугировании в градиенте плотности в присутствии красителя плазмиды не разделяются по размеру.

После центрифугирования их можно извлечь из пробирки, собрав фракции, начиная с верха или со дна. Можно также проколоть пробирку сбоку иглой со шприцом и отобрать плазмидную фракцию, не раскапывая весь градиент.

Если в пробирке достаточно плазмидной ДНК, красная полоса, в которой она сконцентрирована, видна без освещения длинноволновым УФ-светом.

При щелочной экстракции осаждается большая часть геномной ДНК, РНК и белков. Если после щелочной экстракции провести центрифугирование в градиенте плотности с интеркалирующим красителем, то можно получить чистую плазмидную ДНК с высоким выходом, не загрязненную фрагментами геномной ДНК.

Метод основан на том, что в щелочных условиях (рН 12.0-12.5) происходит денатурация линейных молекул, т.е. разделение цепей двойной спирали ДНК, в то время как ковалентно замкнутые молекулы не денатурируют. Когда клеточный экстракт нейтрализуют при высокой концентрации соли, геномная ДНК осаждается. Происходит это, вероятно,

потому что длинные одноцепочечные молекулы ДНК реассоциируют случайным образом и образуют нерастворимую массу.

Большая часть клеточной РНК также осаждается вместе с белками, так как реакцию проводят в присутствии додецилсульфат натрия (ДСН).

Методика щелочной денатурации, описанная [Birnboim et al., 1979], или ее модификации широко используются для получения мимнипрепаратов плазмидной ДНК, т.е. небольших количеств ДНК приблизительно из 1 мл. бактериальной культуры, достаточно чистой для расщепления эндонуклеазами рестрикции.

2.2.2.1. Рост бактерий и амплификация плазмиды.

Бактериальную культуру клеток *E.coli*, штамм DH5 α , несущих плазмиды pVi 131 и pVi 121, наращивали в ночной культуре в присутствии антибиотика ампициллина 100х (Ap =100 мг./мл) на бактериальной среде LB.

Состав среды LB (Лурия-Бертани) на 1 л.:

триптон – 10 г.,

дрожжевой экстракт – 5 г.

NaCl - 10 г.

Осторожно отбирали отдельную выращенную колонию и инкубировали в течение ночи на среде LB.

Высевали 2.5 мл. ночной культуры в колбу объемом 2л., содержащую 500 мл. среды LB с ампициллином 100х.

Инкубировали при 37⁰C при интенсивном встряхивании до тех пор, пока плотность клеток не достигнет 0.4-0.5, что соответствует приблизительно 48 часам культивирования. При более высокой концентрации клеток снижается амплификация плазмид. Добавляли 2.5 мл. спиртового раствора хлорамфеникола (34 мг./мл в этаноле). Инкубировали еще 12-16 часов.

2.2.2.2. Сбор бактерий.

Собирали бактериальные клетки центрифугированием при 4000 об/мин. в течение 10 минут при 4⁰С. Сливали надосадочную жидкость (супернатант). Промывали клетки 100 мл. охлажденного во льду буфера STE.

Состав буфера STE: 1) 0.1 М NaCl;
2) 10 мМ трис- HCl, pH 7.8;
3) 1мМ ЭДТА.

2.2.2.3. Выделение плазмидной ДНК методом «Мини-преп».

Метод «Мини-преп» (минимальные препараты) - быстрый и удобный метод выделения небольших количеств плазмидной ДНК, при его постановке мы брали 8 мл среды и разливали в пробирки объемом 50 мл, получая 10-30μг ДНК на 1.5 мл культуры.

Центрифугировали в течение 1 минуты 1.5 мл культуральной среды. Ресуспендировали в 3.3μл GTE (глюкоза 50мМ, трис-HCl 25мМ, pH 8.0, ЭДТА, 10мМ, pH 8.0. Добавляли 300 μл свежеприготовленного раствора 2. Затем, закрыв пробирку, перемешивали содержимое несколько раз вручную.

Состав раствора 2: 1) 0.2 н. NaOH;
2) 1% SDS.

Готовили из исходных растворов 10 н. NaOH и 20% SDS. Добавляли 300 μл охлажденного во льду 0.2М ацетата калия, pH 4.8. Перемешивали вручную и инкубировали 5 минут на льду.

Центрифугировали в роторе Beckman J2-21M при 20 000 об/мин. 10 минут при 4⁰С.

Переносили равный объем супернатанта в две новые пробирки и добавляли RNase до конечной концентрации 20μг/мл. Инкубировали при 37⁰С в течение 20 мин.

Добавляли в каждую пробирку 400µл хлороформа, тщательно перемешивали вручную и оставляли на 15 минут при комнатной температуре. Добавляли 700 µл изопропанола. Сливали супернатант, промывали осадок 70% этанолом и высушивали осадок ДНК.

Растворяли осадок ДНК в 32 µл дистиллированной воды, довели до 8.0 мл. 4М раствором NaCl и добавляли 13% ПЭГ₈₀₀₀, затем хорошо смешивали и инкубировали на льду 20 мин.

Центрифугировали 15 мин. при 4⁰С, осторожно отбирали супернатант и добавляли 500 µл 70% этанола. Сушили пробирки с осадком ДНК 3 минуты. Затем растворяли ДНК в 20 µл дистиллированной воды. Препарат хранили при температуре -20⁰С.

В эксперименте использовали деионизированную дистиллированную воду, 100% изопропанол, 70% этанол, RNase A 10мг/мл., 13% ПЭГ (полиэтиленгликоль) молекулярной массой 8000.

На этом этапе растворенная ДНК готова к очистке равновесным центрифугированием в градиенте хлористого цезия с бромистым этидием.

2.2.2.4. Очистка ковалентно замкнутой кольцевой ДНК равновесным центрифугированием в градиенте хлористого цезия.

На каждый миллилитр раствора ДНК добавляли 1 г хлористого цезия (CsCl) и осторожно перемешивали до полного растворения соли. На каждые 10 мл раствора с CsCl добавляли 0.8 мл бромистого этидия (10 мг/мл в воде). Концентрация бромистого этидия достигала 600 µг/мл.

Переносили раствор CsCl в центрифужные пробирки объёмом 50 мл., которые сверху заполняли вазелиновым маслом и центрифугировали при 45000 об/мин. в течение 36 час при 20⁰С. Просматривали пробирки. При обычном освещении были видны две полосы ДНК. Верхняя полоса - это линейная ДНК с одноцепочечными разрывами, нижняя полоса - ковалентно замкнутая плазмидная ДНК. Собирали материал нижней полосы ДНК.

Удаляли бромистый этидий добавлением равного объема изоамилового спирта, затем интенсивно пипетировали и центрифугировали при 15000 об/мин. при комнатной температуре, отбирали водную фазу и центрифугировали на том же режиме до исчезновения розовой окраски воды.

2.2.3. Получение генно-инженерной конструкции, несущей репортерный ген β - глюкоронидазы *gus* и ген зеленого флуоресцирующего белка *gfp*.

2.2.3.1. Молекулярные основы рестрикции ДНК.

Рестрикция – это процесс расщепления линейных одноцепочечных, двухцепочечных и ковалентно-закрученных кольцевых молекул ДНК вследствие гидролиза связей между фосфатом и гидроксильной группой с 5' - фосфатного или 3'-гидроксильного концов.

Ферменты рестрикции делятся на экзонуклеазы и эндонуклеазы.

Экзонуклеазам рестрикции для гидролиза необходимо узнать свободный одноцепочечный конец.

Эндонуклеазы рестрикции узнают двухцепочечную ДНК, так что им не нужны одноцепочечные концы, и разрезают молекулу по внутренним фосфодиэфирным связям, при этом образуются фрагменты разной длины. Эндонуклеазы могут осуществлять рестрикцию кольцевых молекул ДНК.

Эндонуклеазы подразделяют на три типа по характеру гидролиза: тип 1, тип 2, тип 3.

Эндонуклеазы типа 1 – это сложные белки, обладающие активностями рестриктирующей эндонуклеазы и метилазы, делают двухцепочечные разрезы на разном расстоянии от сайтов узнавания, варьирующем от 700 н.п. до 7 т.н.п. Для осуществления ферментативного гидролиза необходимы Mg^{2+} , АТР и S-аденозилметионин, который активирует фермент, т.е. эндонуклеазы типа 1 являются ДНК-зависимыми АТР-азами.

Эндонуклеазы типа 2- это основной инструментарий в создании рекомбинантных ДНК. Это белки, которые разрезают ДНК по специфическим фосфодиэфирным связям либо в самом сайте узнавания, либо на небольшом расстоянии от него. Для функционирования фермента необходим только Mg^{2+} .

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании фирмы-изготовителя. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляют достаточно жесткие требования, но различия между буферами не значительны.

Ферменты рестрикции в зависимости от ионной силы рабочего буфера делят на три группы:

- 1) ферменты, лучше функционирующие при высокой ионной силе (Xba I, EcoR 1, Mbo 1);
- 2) ферменты, функционирующие в условиях средней ионной силы (Bam HI, Hind III, BstE II);
- 3) ферменты, функционирующие в условиях низкой ионной силы (Sac I, Sma I, Bgl II).

В связи с этим необходимо готовить только три буфера (таблица 2).

Обычно все буферные растворы готовят в виде исходных растворов 10х, которые можно хранить при температуре $4^{\circ}C$ в течение 7-14 дней или при $-20^{\circ}C$ неопределенно долгое время.

Таблица 4. Буферные растворы, используемые при рестрикции ДНК эндонуклеазами (мМ).

Ионная сила раствора	NaCl	Трис-HCl, pH 7.5	MgCl ₂	Дитиотрейтол ¹
Низкая	0	10	10	1
Средняя	50	10	10	1
Высокая	100	50	10	1

1- 1,4-Дитиотрейтол (трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан), восстановитель связей S-S до S-H, имеет низкий окислительно-восстановительный потенциал и поэтому восстанавливает многие тиолы, что приводит к образованию внутримолекулярного дисульфида. В наших экспериментах был использован аналог: бычий сывороточный альбумин.

2.2.3.2. Рестрикция плазмидной ДНК.

К раствору плазмидной ДНК (1µг/20µл раствора) в пробирке «Эппендорф» объемом 2 мл. Добавляли деионизированную дистиллированную воду до объема 18 µл и перемешивали. Добавляли 2µл специфического буфера, индивидуального для каждой рестриктазы (таблица 3) 10x и перемешивали. Добавляли 1 ед. рестриктазы (1 единица фермента- это количество фермента, необходимого для полного расщепления 1 µг ДНК за 1 час в определенном буфере и при определенной температуре в 20 µл раствора) и осторожно перемешивали. Затем смесь инкубировали 1 час при индивидуальной для каждой рестриктазы температуре (таблица 4). Реакцию останавливали 0.5М ЭДТА, pH 7.5.

Сразу проводили анализ плазмидной ДНК в агарозном геле. Для этого добавляли 6 µл красителя в буфере для нанесения, встряхивали смесь и наносили ДНК на агарозный гель.

Таблица 5. Состав буферных растворов, использованных для рестрикции (мМ).

Название рестриктазы	Название Буфера, цвет	Трис-НCl, pH ¹	MgCl ₂	NaCl	KCl	Растворы, содержащие ацетат-анионы	BSA ¹ , мг/мл
Hind III	1x Red	10	10		100		0.1
SmaI	1x Tango yellow					Трис-ацетат 33, Mg-ацетат 10, K-ацетат 66	0.1
(BamHI, EcoRI, SphI, SacI) ²							

1- BSA- бычий сывороточный альбумин, используется для адсорбции фенола.

2- Буферные растворы для этих рестриктаз готовили в соответствии с Fermentas, Catalog 2003-2004, с. 112, с.192.

Таблица 6. Сайты рестрикции и температура активации использованных рестриктаз.

Рестриктаза	Сайт узнавания	Температура активации, °C
Hind III	A↓AGCTT	37
Bam HI	G↓GATCC	37
EcoRI	G↓AATTC	37
Sph I	GCATG↓C	37
Sma I	CCC↓GGG	30
Sac I	GAGCT↓C	37

2.2.3.3. Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле.

Электрофорез в агарозном геле - это стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК.

При разделении в геле следят непосредственно за положением ДНК, так как полосы ДНК можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим красителем – бромистым этидием в низкой концентрации.

Скорость миграции ДНК через агарозный гель определяется пятью параметрами:

- 1) размером молекул ДНК: молекулы линейной двухцепочечной ДНК передвигаются в геле одним концом вперед со скоростью, обратно пропорциональной десятичному логарифму их молекулярных масс;

2) концентрацией агарозы: фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями (таблица 5);

3) конформацией ДНК: ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например, кольцевая неповрежденная ДНК, кольцевая с одноцепочечным разрывом и линейная форма в агарозном геле движутся с разными скоростями;

4) напряженностью электрического поля: при низкой напряженности скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна напряжению, но с увеличением напряженности электрического поля подвижность ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально растет;

5) состава оснований и температуры: в целом эти факторы не оказывают влияния на процесс разделения ДНК, но агарозные гели, содержащие менее 0.5% агарозы очень мягкие и работать с ними следует при температуре +4⁰С, когда они становятся более плотными.

2.2.3.4. Техника электрофореза, использованная в экспериментах.

Готовили агарозный гель, где концентрация агарозы была 1.5% растворением 1.5 г агарозы (Sigma) в 100 мл 1х буферного раствора ТАЕ, который был приготовлен из 50х ТАЕ (0.04М трис-ацетат, 0.002М ЭДТА).

Нагревали раствор и, охладив его до 50⁰С (можно держать рукой), добавляли 5 μ л бромистого этидия, слегка помешивали и заливали гель. Гель застывал в течение 15-20 минут и его сразу же помещали в кювету для электрофореза, наполненную 1х буферным раствором ТАЕ.

На отрезке парафилма раскапывали краситель, с помощью которого можно визуально следить за течением электрофореза. В каждую каплю красителя наносили пробу, пипетировали и сразу же наносили смесь на гель.

Подавали напряжение 90-100В и ждали, когда ДНК пройдет $\frac{3}{4}$ длины и делали фотографию для анализа.

Таблица 7. Влияние концентрации агарозы в геле на эффективность разделения фрагментов ДНК.

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, kb ¹
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

1- 1 kb=1000н.п.

2.2.3.5. Молекулярные основы полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Огромное влияние на молекулярную биотехнологию оказала разработка метода полимеразной цепной реакции [Mullis et al., 1986].

С возможностью получения больших количеств ДНК амплификацией сегментов клонированной или геномной ДНК была решена проблема клонирования ДНК-копий редких молекул м-РНК, скрининга геномных библиотек, выявления генных мутаций, физического картирования хромосом. Первым практическим применением ПЦР было создание тест-системы для диагностики серповидноклеточной анемии [Saiki et al., 1985]/

Амплификация фрагментов ДНК осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса.

Для ПЦР необходимы:

1) два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно 20 нуклеотидов, комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим последовательность – мишень;

2) ДНК-мишень длиной от 100 до 35000 н.п.;

3) термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет активности при температуре 95⁰ и выше;

4) четыре дезоксирибонуклеотида: дезоксирибоаденозинтрифосфат (dATP), дезоксириботимидинтрифосфат (dTTP), дезоксирибоцитозинтрифосфат (dCTP), дезоксирибогуанозинтрифосфат (dGTP).

ПЦР состоит из трех реакций, которые составляют 1 цикл:

1) денатурация: состоит в тепловой денатурации образца ДНК при 94⁰С, когда происходит разъединение цепей, т.е. распад двухцепочечной структуры в течение минимум 1 минуты;

2) ренатурация: температура смеси медленно понижается до приблизительно 55⁰С, праймеры комплементарно спариваются с ДНК;

3) синтез: температура повышается до 72-75⁰С, оптимальной для Taq-полимеразы, которая связывается с ДНК, и начинается синтез комплементарной цепи, иницируемый 3'-ОН группой праймера.

Все реакции проводятся в специальном приборе - амплификаторе, где задается определенная программа ПЦР: количество циклов, объем рабочей смеси в пробирке, температурный и временной режимы.

2.2.3.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР ставили для обнаружения встраивания промоторов 35S GUS и RBC/O в создаваемые векторы, для обнаружения сделанных конструкций после клонирования в *E.coli* и оценки эффективности промоторов, разделяя их по молекулярной массе при электрофорезе.

При постановке ПЦР использовали праймеры производства НПФ «ЛИТЕХ»:

прямой праймер 35S (длина 27н.):
5'TATCgTTCAAATgCCTCTgCTCCgACAgt3' ;

обратный праймер 35S (длина 27 н.):
5'gATTgTgCgTATCCCTTACgTCAgtg3';

прямой праймер RB-F-Hind (длина 34 н.):
5'gCgCAAgtTgTgggAACgAgATAAgggCgAAgt3' ;

прямой праймер RB-R-Xba (длина 31 н.):
5'gCgTCTAgATgTTAATTACACTTAgACAgtAA3';

прямой праймер RB-R (длина 22 н.):
5'TgTTAATTACACTTAgACAgtAA3';

прямой праймер RB-F-1418 (длина 20н.): 5'gAACgAgATAAgggCgAAgt3' ;

обратный праймер RB-R-1418 (длина 18н.): 5'AgCAAgtAACCCATCCAT3'

Готовили общий раствор (таблица 6), в который вносили все компоненты, кроме образцов ДНК.

Образцы ДНК включали положительный контроль (маркер DNA Ladder, 50 b.p.), отрицательный контроль (отсутствие ДНК) на присутствие неспецифических продуктов амплификации и образцы ДНК промоторов 35S GUS и RBC/O, обработанных рестриктазами Hind III и XbaI из плазмиды pVi 121 и pVi 131, соответственно, и промотора RBC/O, взятого из генома растений табака сорта Petit Havana. Образцы вносили в количестве 1μл.

Добавляли две капли минерального масла в каждую пробирку и помещали в амплификатор («Терцик», ДНК-технология) на 2 часа.

Для амплификации использовали программу:

1- 94.0⁰ - 2 мин. x1

2 – 62.0⁰ - 10 сек. x5

3 – 72.0⁰ - 5 сек. x20

4 - 72.0⁰ - 2 мин. x1

Объем 25.05μл.

Таблица 8. Общий раствор для ПЦР.

Название реагента	Объем реагента на 1 реакцию, μл.	Объем реагента на 8 реакций, μл.
Деионизированная дистиллированная вода	18.0	144.0
Буфер для ПЦР, 10x	2.5	20.0
dNTP	0.5	4.0
Mg ²⁺	0.75	6.0
Праймер R	1.0	1.0
Праймер F	1.0	1.0
Тaq-полимераза	0.3	2.4
Образец ДНК	1.0	1.0
Число реакций - 8	Σ объем раствора: 25.05	179.4

2.2.4. Выделение протопластов из растений табака *Nicotiana tabacum*.

Сущность метода выделения протопластов состоит в удалении клеточной стенки так, чтобы в них не возникало никаких изменений. Для этого наружное и внутреннее осмотическое давление должно быть таким, чтобы клетки не разрушались и не наблюдалось лизиса протопластов.

Для выделения протопластов обычно используют молодое растение, еще не начавшее цветение.

На процесс выделения протопластов действуют следующие факторы, при которых растет растение – донор для выделения протопластов: интенсивность освещения, фотопериод, влажность и температура.

2.2.4.1. Метод выделения протопластов, использованный в работе.

Для выделения протопластов использовали модифицированную методику [Takebe et al., 1971].

Готовили раствор, состоящий из 0.4 М маннита (в 500 мл дистиллированной воды растворяли 36.44 г D-маннита), 1% целлюлазы Onozuka и 0.5% мацеразима Onozuka. Приготовленный раствор стерилизовали фильтрованием через бактериальный фильтр в стерильную колбу.

Срезанные с растений табака *in vitro* листья разрезали на сегменты, вырезая центральную жилку, и помещали их в чашки Петри с раствором фермента. Инкубировали листовые сегменты в темноте при температуре 22-25⁰С в течение 12-14 часов. После этого сегменты листьев, находящиеся в ферменте осторожно встряхивали, отделяя протопласты от остатков ткани листа, фильтровали через сеточку (150-200 мкм), помещали в стерильные пробирки и освобождали от фермента центрифугированием при 100 g в течение 15 мин. Удалив супернатант, осадок осторожно суспендировали в растворе маннита и центрифугировали еще 2 раза по 10 мин. при тех же условиях. Очищенные от остатков ткани и фермента протопласты ресуспендировали в растворе для трансфекции.

2.2.4.2. Трансформация протопластов.

Основа трансформации протопластов – это явление пиноцитоза, которое заключается в том, что протопласт до образования внешней новой оболочки, окруженный тонкой внешней мембранной, может поглощать крупные молекулы.

При пиноцитозе клеточная мембрана выгибается внутрь протопласта, отсоединяется от поверхности и крупная молекула, вирус, хлоропласт,

белковая молекула, прокариотическая клетка оказывается внутри протопласта

Трансформацию протопластов можно проводить двумя методами: электропорацией и с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Метод электропорации осложняется трудностями, связанными с регулированием напряженности электрического поля, подбора буферных растворов и не всегда приводит к существенному результату.

Поэтому мы трансформировали протопласты с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) разной молекулярной массы: ПЭГ₂₀₀₀, ПЭГ₄₀₀₀ и ПЭГ₆₀₀₀ и разной концентрацией раствора (10%, 15%, 20%) для оптимизации процесса, так как нет однозначных данных о влиянии молекулярной массы ПЭГ на эффективность транзientной экспрессии.

Трансформацию протопластов табака проводили в соответствии с методикой [Takebe et al., 1971].

Протопласты, суспендированные в растворе W 5 в концентрации 5×10^5 в 1 мл (подсчет протопластов проводили в камере Фукса-Розенталя для подсчета форменных элементов крови по формуле $A \times 16 \times 1000 / 3.2$, где А – число протопластов в 1 большом квадрате), раскапывали на дно чашки Петри по 100 мкл, через 10 мин. добавляли 5 мкл плазмиды и 80 мкл ПЭГ, приготовленного на сахарозе или манните. Раствор W 5 имел следующий состав: 0.154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl₂, 5 мМ KCl, 5 мМ глюкоза, 1.5 мМ MES-KOH (калиевая соль 2-(N-морфолино)-этаносульфоновой кислоты). Выдерживали 15-20 мин. и разводили 1.25 мл среды для инкубации следующего состава: соли, инозит, витамины по МС, 0.4 М сахароза, БАП – 2 мг/л, НУК – 1 мг/л, 2.4Д – 1 мг/л.

Раствор протопластов помещали в темную камеру при температуре 25°C на 24-48 час.

2.2.4.3. Определение транзientной экспрессии гена *gus*.

Транзientную экспрессию гена *gus* определяли флуориметрическим методом в присутствии флуоресцирующего субстрата 4-метилумбеллиферил-D- глюкуронида (4-MUG) в соответствии с (Jefferson, 1987).

3. Результаты и обсуждение.

В экспериментах была использована плаزمида pVi 121, из которой по сайтам рестрикции Hind III и BamHI вырезали промотор вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) 35S CaMV и вставляли его в плазмиду pVi 101, в результате чего ставили под контроль этого конститутивного промотора ген β -глюкуронидазы gus, который к этому моменту уже находился в кассете pVi 101. Так получили вектор pVi 101 35S CaMV-GUS .

Затем из плазмиды pVi 101 конструкцию 35S CaMV-GUS клонировали в небольшую плазмиду pUC 19 по сайтам рестрикции Hind III и EcoRI, получив вектор pUC 19 35S CaMV-GUS .

Далее из плазмиды pVi 131 вырезали тканеспецифичный промотор гена малой субъединицы фермента рибулезобифосфаткарбоксилазы - оксигеназы (RBC/O) по сайтам рестрикции Hind III и Sph 1, и вставляли его в pVi 101 перед репортерным геном GUS путем лигирования этого фрагмента по сайтам рестрикции Hind III и BamHI. Так был получен вектор pVi 101 RBC/O-GUS.

После чего переносили созданную конструкцию в плазмиду pUC 19 лигированием по сайтам рестрикции Hind III и EcoRI. Таким образом был получен вектор pUC 19 RBC/O-GUS.

Для клонирования в клетках *E.coli* использовали созданный вектор pUC 19 RBC/O-GUS.

В результате проведенных экспериментов мы получили генно-инженерную конструкцию, несущую репортерный ген β - глюкуронидазы GUS под контролем 35S CaMV промотора и nos – терминатора (рис.1), которая была лигирована в область полилинкера плазмиды pUC 19 и клонирована в клетках *E.coli*.

Конститутивный промотор инициировал транскрипцию гена GUS, обеспечивая процессинг РНК в ядре, белковый продукт переносился по

микротрубочкам в определенный район цитоплазмы, где и регистрировалась транзистная экспрессия.

Сайт полиаденилирования polyA защищал последовательность гена с 3'-конца от рестрикции экзонуклеазами в компартментах цитоплазмы, что повышало вероятность экспрессии гена.

Последовательность гена с 5'-конца защищена от действия экзонуклеаз метилированием гуанина.

Также экспрессия гена GUS в наших экспериментах повышалась под влиянием альтернативного сплайсинга, в результате чего в цитоплазму экспортировалась последовательность, состоящая только из экзонов.

Но под действием изменения осмотического давления в протопласте вполне вероятно изменение конформации последовательности транскрибируемой РНК за счет изменения пространственной структуры белкового комплекса, транспортирующего фрагмент РНК в цитоплазму и деформации плазмаллемы компартмента.

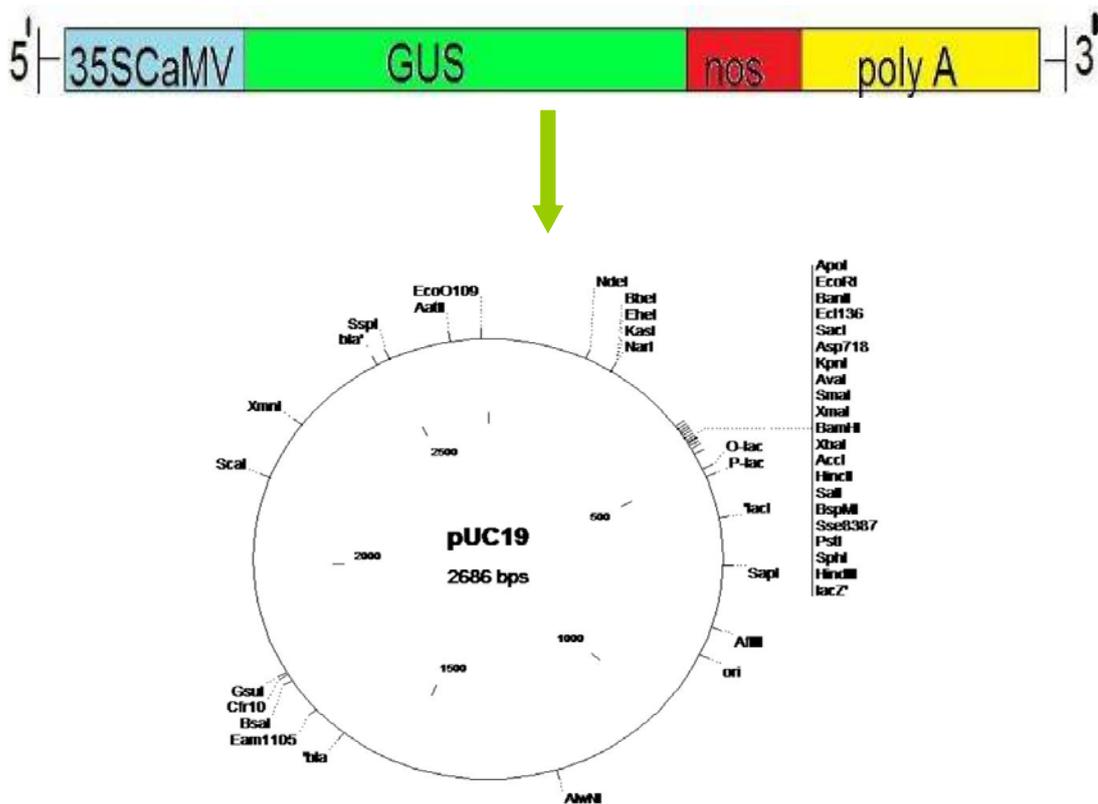


Рисунок 1. Генно-инженерная конструкция pUC 19 35S CaMV-GUS. Эта конструкция получена в результате рестрикции 35S ВМЦК промотора из плазмиды pVi 121 по сайтам HindIII и BamHI и лигированием его с 5'-концом последовательности гена GUS.

RBC/O-промотор был вырезан из плазмиды pVi 131 по сайтам рестрикции Hind III и Sph I и лигирован с 5'-концом последовательности гена GUS. Эту конструкцию переносили в плазмиду для клонирования pUC 19 (рис.2).

При трансформации протопластов геном, находящимся под контролем данного промотора, экспрессия детектируется только в хлоренхиме листа,

так как промотор RBC/O запускает экспрессию контролируемого гена только в фотосинтезирующих тканях.

Созданная генно-инженерная конструкция экспрессировалась в основном в компартментах клетки, расположенных вблизи хлоропластов или связанных с ними плазмаллемой.

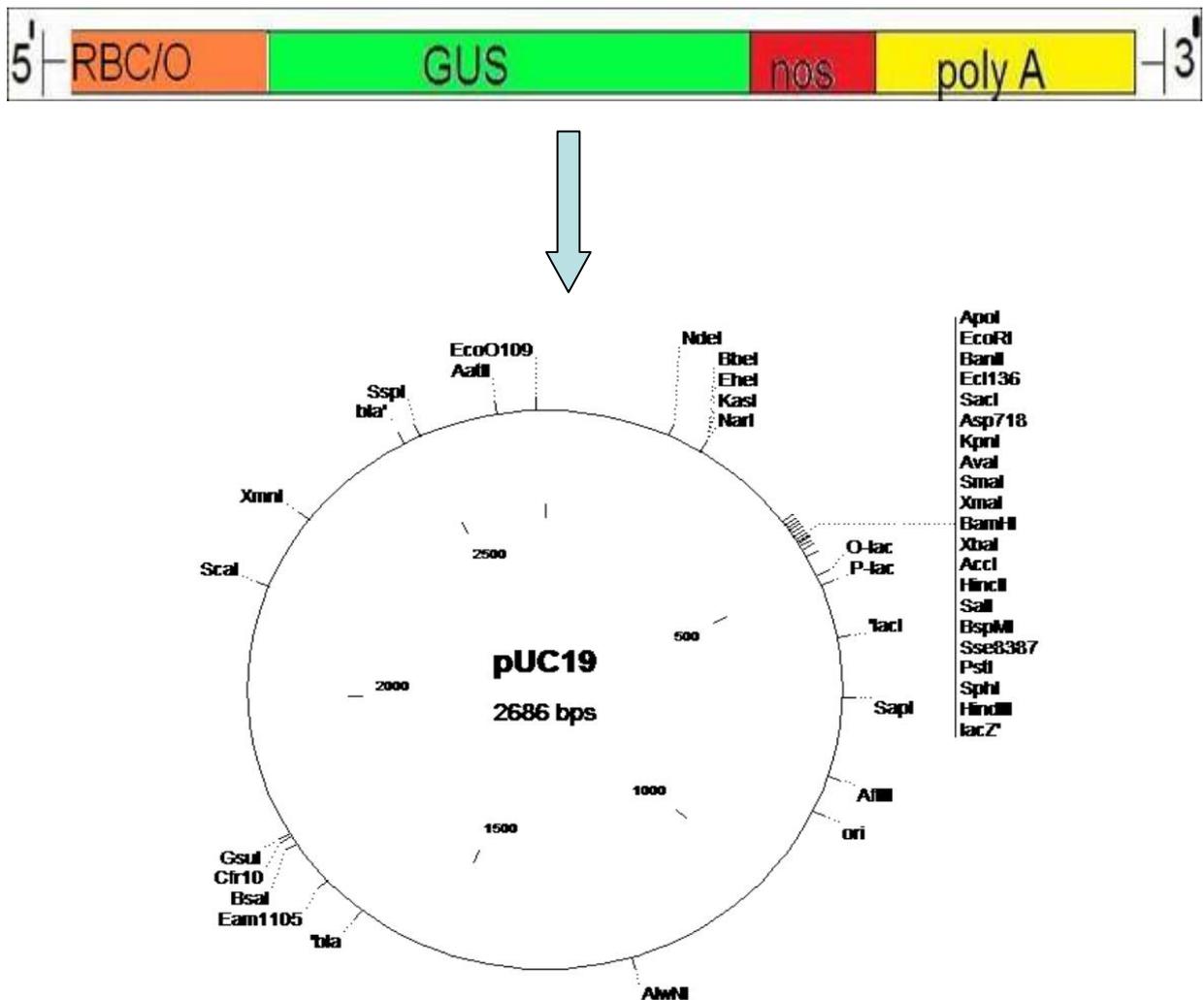


Рис. 2 Генно-инженерная конструкция pUC 19 RBC/O-GUS. Эта конструкция получена в результате переноса последовательности гена GUS, находящейся под контролем промотора малой субъединицы гена рибулезобифосфаткарбоксилазы-оксигеназы RBC/O из плазмиды pVi 101 в плазмиду для клонирования pUC 19 по сайтам рестрикции Hind III и Xba I.

Полученная конструкция была клонирована в клетках *E.coli*, после чего проводили анализ ее наличия в составе клонирующего вектора методом ПЦР (рис. 4).

Для анализа встраивания конструкций, несущих ген GUS, в состав клонирующих векторов была подобрана индивидуальная программа ПЦР.

С этой целью ставили серию ПЦР, отличающихся температурным режимом элонгации и анализировали характер амплификации одной и той же пробы в двукратной повторности, качественно оценивая наличие неспецифических продуктов амплификации и степень детекции фрагмента ДНК в каждом варианте.

Вероятно, что на накопление неспецифических продуктов амплификации оказывали влияние возможные дубликации участков последовательностей ДНК в процессе копирования новых цепей.

Этим же можно объяснить и различия в концентрации детектируемой ДНК.

Так как Таq-полимераза не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК, то при оптимизации режима элонгации в ПЦР мы использовали линейную ДНК гена GUS длиной примерно 1.4 kb.

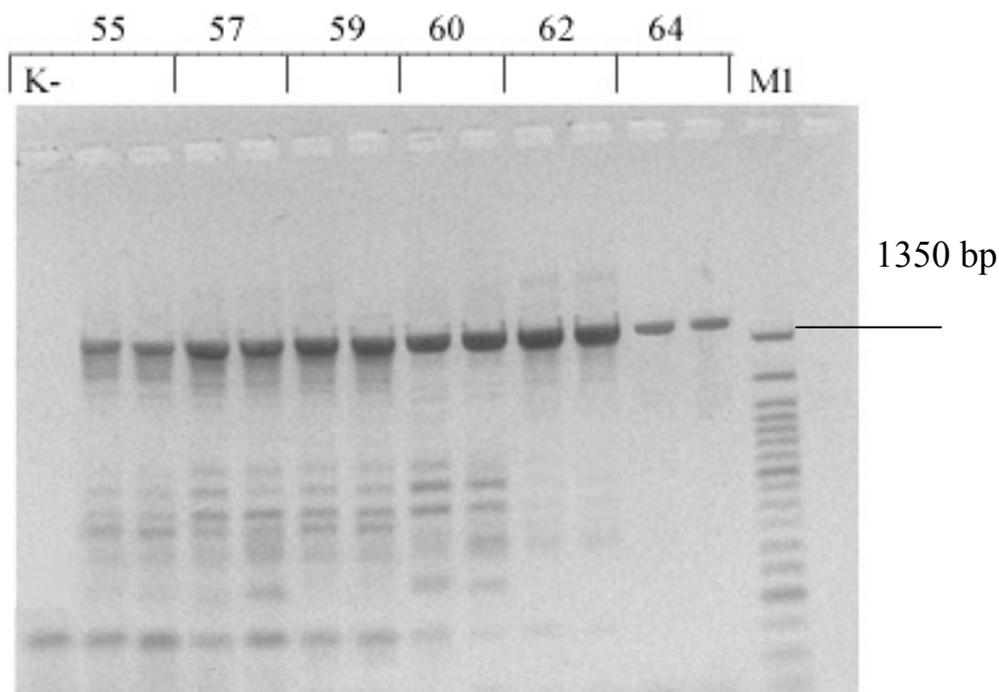


Рис. 3 Электрофорез последовательности гена GUS, проведенный для оптимизации температуры элонгации в процессе ПЦР. В качестве сравнения вариантов апробируемого образца использовали молекулярный маркер размером 50 – 1350 н.п.(New England Biolabs). Маркер большего диапазона был специально взят, чтобы уловить весь спектр неспецифических продуктов амплификации.

При сравнении различных вариантов исследуемого образца ДНК обнаружена дифференцировка по накоплению неспецифических продуктов амплификации, и прослеживалась четкая обратно пропорциональная зависимость присутствия неспецифических продуктов амплификации от изменения температуры элонгации в процессе ПЦР.

К тому же, при температурах элонгации 55 и 64⁰С наблюдалась резкое снижение концентрации детектируемой ДНК.

На основе этих выводов мы определили, что оптимальной начальной температурой элонгации является температура 62⁰С, так как при данной температуре наблюдалось минимальное число неспецифических продуктов амплификации и самая высокая концентрация исследуемой ДНК.

Нами был проведен сравнительный анализ двух экспрессибельных промоторов: конститутивного 35S CaMV промотора из вируса мозаики цветной капусты и тканеспецифичного промотора гена малой субъединицы рибулезобифосфаткарбоксилазы – оксигеназы (RBC/O).

Промотор гена малой субъединицы фермента рибулезобифосфаткарбоксилазы-оксигеназы RBC/O имел больший молекулярный вес по сравнению с 35S промотором ВМЦК (рис.5) и поэтому был способен контролировать экспрессию фрагмента, имеющего длину больше чем длина гена GUS, но при этом эта экспрессия была менее стабильна, чем в случае использования 35S промотора ВМЦК и регистрировалась вблизи хлоропластов.

Конститутивный 35S промотор ВМЦК имел меньшую молекулярную массу по сравнению с RBC/O и поэтому контролировал более короткий

фрагмент, но с него регистрировалась стабильная сильная экспрессия гена GUS по всему протопласту.

Из этого можно сделать вывод, что следует ориентироваться на конструкции, где репортерные гены стоят под контролем 35S CaMV промотора, и ставить целевой ген под контроль данного промотора.

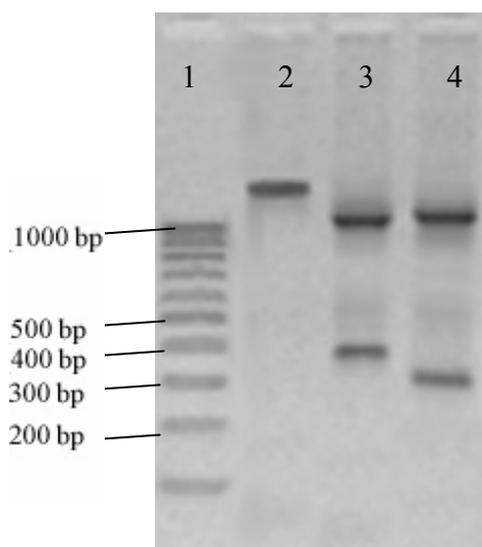


Рис. 4 Электрофорез для анализа клонирования конструкций RBC/O-GUS и 35S-GUS: молекулярный маркер размером 100-1000н.п. (1 дорожка), последовательность гена GUS (2 дорожка); последовательность гена GUS, контролируемая промотором гена RBC/0 (3 дорожка) и промотором 35S CaMV (4 дорожка) в 1.5% агарозном геле.

Выделяли протопласты с использованием фермента Onozuka, который растворяли из расчета: 1 часть фермента в 10 мл. воды с добавлением 0.3 М сахарозы и 0.1М маннита, и мацерозима, который готовили таким же образом.

На первом этапе мы использовали фермент Onozuka в концентрации 1.5% и 0.5% и мацерозим в концентрации 0.5% и 0.05% вместе с осмотиком сахарозой и получили культуру протопластов плотностью 2×10^6 .

На следующих этапах, оптимизируя методику выделения протопластов, нами были испытаны варианты, в которых в качестве осмотика выступал 0.4М маннит и вариант, где применялась 0.3М сахароза в сочетании с 0.1М маннитом. Концентрации ферментов по сравнению с первым экспериментом не изменялись.

В результате протопласты выделились лучше при использовании 0.4М маннита. Плотность протопластов составила приблизительно 2×10^6 .

При совместном действии 1% фермента Onozuka и 0.5% мацерозима и применении 0.4М маннита протопласты выделялись чистыми и очень четко выполненными (рис. 9)

Плотность протопластов при этом составила 0.67×10^6 .

Трансформацию протопластов с помощью ПЭГ осуществляли, исходя из максимальной концентрации ПЭГ 20%.

Нами были получены трансформированные жизнеспособные протопласты при трансформации геном GUS с обработкой материала ПЭГ в течение 15 минут и использованием маннита (таблица 9).

Таблица 9. Влияние объема раствора и времени обработки ПЭГ на жизнеспособность трансформированных протопластов.

Ген	Объем раствора ПЭГ, мл.	Время обработки, мин.	Тип осмотика	Жизнеспособность
GUS	80	18	сахароза	-
	40	15	сахароза	-
	120	15;16;20	маннит	+
	40	15	маннит	+

Жизнеспособные трансформированные протопласты получали при обработке раствором ПЭГ объемом 40 мл. в течение 15 минут в присутствии маннита и раствором ПЭГ объемом 120 мл. в течение 15, 16 и 20 минут в присутствии маннита.

В этих условиях трансформации мы получили протопласты, характеризующиеся стабильной структурой клеток и органелл, их наибольшей выполненностью в связи с наименьшим повреждением плазматических мембран.

Хотя транзистная экспрессия протопластов была выше при использовании в качестве осмотика сахарозы.

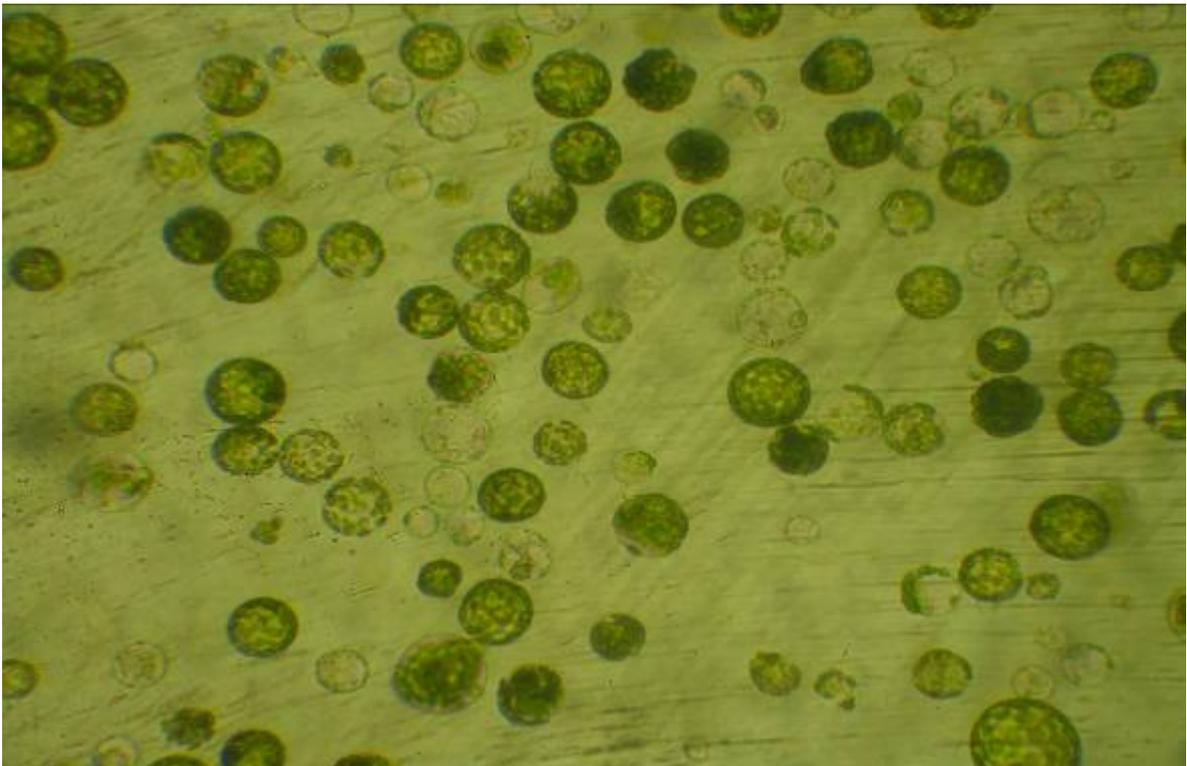


Рис.5 Протопласты, выделенные из листьев растений *in vitro* *Nicotiana tabacum* сорта *Petit Havana* (x275). Протопласты выделяли по стандартной методике, разработанной Takebe et al. (1971) с применением 1% целлюлазы Onozuka и 0,5% мацерозима Onozuka, растворенных в 0,4М манните.

При определении транзientной экспрессии гена GUS относительная флуоресценция экстрактов, обработанных 4-метилумбелиферилл – D-глюкуронидом (4-MUG), была существенно выше в варианте с использованием сахарозы (около 0.2 оптических единиц).

Эксперимент проводили в пятикратной повторности.

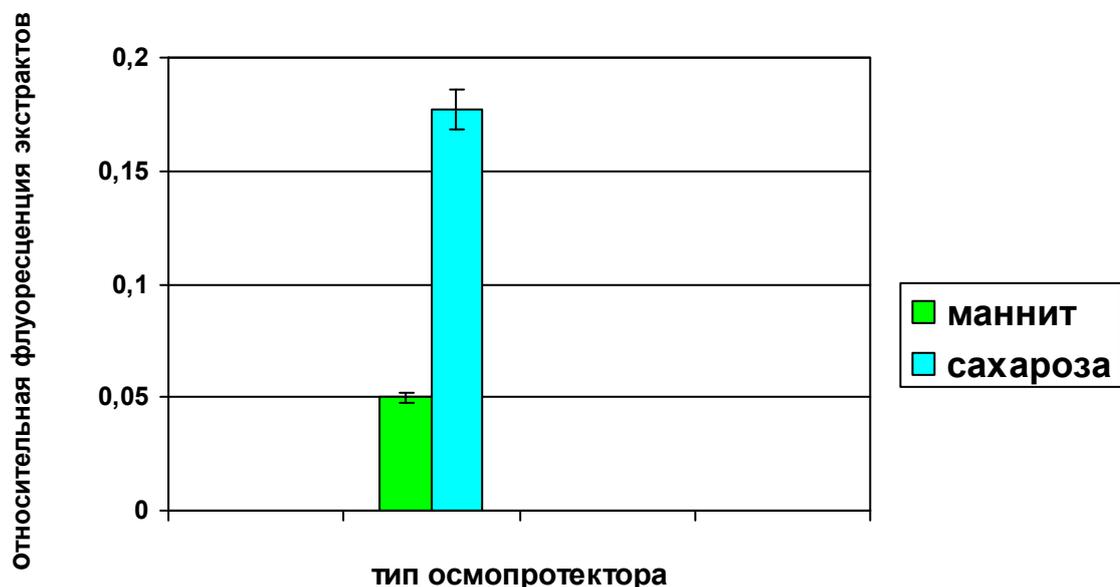


Рис. 6 Влияние осмотиков маннита и сахарозы на транзиентную экспрессию гена GUS в протопластах табака.

Транзиентная экспрессия в протопластах. Протопласты были трансформированы контрольной конструкцией 35S-GUS (pBi 121, Clontech, USA), содержащей репортерный ген фермента β -глюкуронидазы под контролем конститутивного промотора 35S CaMV. Из всех параметров трансформации наибольший эффект оказало культивирование в питательной среде с сахарозой вместо маннита. Флуоресценцию экстракта суспензии протопластов определяли по взаимодействию с субстратом 4- MUG.

4. Выводы по результатам исследования.

1. Была получена генно-инженерная конструкция pUC 19 35S CaMV-GUS, которая давала высокую транзientную экспрессию в модельной системе растительных протопластов *Nicotiana tabacum L.*
2. Был оптимизирован метод ПЦР для одновременного анализа экспрессибельности конститутивного 35S CaMV промотора и тканеспецифичного RBC/O-промотора.
3. Был проведен сравнительный анализ экспрессибельности конститутивного 35S CaMV и тканеспецифичного RBC/O-промоторов, который показал целесообразность применения 35S CaMV промотора для усиления экспрессии конструкции, несущей целевой ген цитохромоксидазы C1.
4. Был оптимизирован метод трансформации протопластов : определена наилучшая концентрация и время экспозиции ПЭГ, тип и концентрация осмопротектора, при которых были получены жизнеспособные трансформированные протопласты.
5. Для поддержания культуры трансформированных протопластов рекомендуется использовать в качестве осмопротектора маннит, для получения высокой транзientной экспрессии конструкции в протопластах – сахарозу.

