

# КОНСТРУИРОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *HELIANTHUS TUBEROSUS* L. С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ГЕНОМ ЛЕВАЗАЗЫ

А.Н. АРЗУМАНЯН, И.Л. БАЗУКЯН, Ю.Г. ПОПОВ

Ереванский государственный университет,  
кафедра микробиологии и физиологии растений, 375049

Сконструирована рекомбинантная плазмида pAPL, несущая леваназный ген *sacC* *Bacillus subtilis*, экспрессия которого контролируется сигналами инициации транскрипции промотора I' из Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* и сигналами полиаденилирования polyA g7, функциональными в растительных клетках. Полученная конструкция была использована для трансформации агробактериальных клеток с последующим переносом в топинамбур. Получены устойчивые к канамицину растения топинамбура, что позволяет предположить интеграцию рекомбинантной конструкции, содержащей леваназный ген, с геномом растительной клетки.

Ստացվել է *Bacillus subtilis*-ի *sacC* լանազային գեն կրող ռեկոմբինանտ pAPL պլազմիդ: Գենի էքսպրեսիան վերահսկվում է *Agrobacterium tumefaciens*-ի T-ԴՆԹ-ի I' պրոմոտորի տրանսկրիպցիայի և polyA g7 պոլիադենիլացման ազդանշանների միջոցով, որոնք գործում են բուսական բջիջներում: Ստացված կոնստրուկցիան օգտագործվել է ագրոբակտերիալ բջիջների տրանսֆորմացիայի համար տոպինամբուրի մեջ նրանց հետագա տեղափոխման նպատակով: Ստացված են տոպինամբուրի կանամիցինակայուն բույսեր, ինչը փոխ է տալիս ենթադրելու լանազային գեն պարունակող ռեկոմբինանտ կոնստրուկցիայի ինտեգրացումը բուսական բջիջների գենոմի հետ:

It was constructed recombinant plasmid pAPL which contained *Bacillus subtilis* levanase gene *sacC* with initiation signals of transcription controlling region of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA I' promoter and polyadenylation signals polyA g7. Both of them are functional in plant cells. The construction was used for *Agrobacterium* cells transformation following by their transfer into the topinambur. Kanamycin resistant plants were obtained. It permits to suggest integration of recombinant construction containing levanase gene with the plant genome.

## Леваназа - рекомбинантная ДНК - трансформация - топинамбур

Развитие методов генной инженерии, осуществляющих клонирование чужеродных генов в растительных клетках, позволяет конструировать растения, обладающие новыми признаками. С доказательством естественной рекомбинации между агробактериальной плазмидной ДНК и хромосомами высших растений стало возможным применение Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* в качестве переносчиков (векторов) генов в растительные клетки [4].

В растениях уже показана экспрессия различных бактериальных, животных и неродственных растительных генов [2, 4].

Цель работы - разработка целостной системы экспериментов, позволяющих осуществить клонирование чужеродных генов на примере переноса леваназного гена *sacC* *Bacillus subtilis* в клетки топинамбура. Разработанная система послужит моделью для получения трансгенных растений. Кроме того, перенос в топинамбур леваназного гена, расщепляющего полифруктаны, в том числе инулин, которым богаты клубни топинамбура, позволит подойти к разработке методов воздействия

на углеводный обмен топинамбура.

**Материал и методика.** Ген леваназы *sac C B.subtilis*, кодирующий внеклеточную  $\beta$ -D-фруктозилтрансферазу [7], был клонирован в экспрессионном векторе pAP2034 [13], представленном лабораторией молекулярной генетики растений Института общей генетики РАН. Источником гена *sac C* служила рекомбинантная плазмида rIPS, сконструированная в НИИ "Биотехнология". Стандартные процедуры клонирования проводили в соответствии с протоколами, описанными в руководстве [3]. Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса [5]. Трансформацию кальцинированных клеток *E.coli* проводили по методу Мандела и Хига [10]. Полученные компетентные клетки выдерживали при 4° в течение 12-24 ч для повышения эффективности трансформации. Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами и лигирование с использованием полинуклеотидлигазы фага T4 осуществляли в универсальных буферах [3] при 37° в течение 2-3 ч (для рестрикции) и при 12° 10-12 ч (для лигирования). Анализ ДНК проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (0,7-0,8%), приготовленном на трис-ацетатном буфере при напряженности электрического поля 5 В/см [3]. В качестве маркеров для определения размеров фрагментов использовали ДНК фага  $\lambda$ , расщепленную рестриктазами HindIII и PstI.

Полученную конструкцию с помощью прямых методов трансформации [1], в том числе электропорации, переносили в штамм *A.tumefaciens* C58C1, содержащий плазмиду pGV3850 [14]. Электропорацию проводили в приборе, предоставленном НИИ "Биотехнология", при 4° в объеме 20 мкл и напряженности электрического поля 300 кВ/см  $\pm$  30 В/см с разрядной емкостью 20-70 мкФ. Оптимальной оказалась разрядная емкость 70 мкФ. Агробактериальные трансформанты отбирали на соответствующих селективных средах [1] с антибиотиками.

Гибридизацию ДНК проводили по методу описанному в руководстве [3].

Трансформацию растений осуществляли методом "листовых дисков" [1]. Как каллусы, так и поддерживаемые *in vitro* стерильные интактные растительные линии получали из клубней, побегов, верхушечных почек. Растительный материал тщательно промывали и после соответствующей обработки высевали на базовые питательные среды Мурасиге-Скуга с соответствующими гормонами [12].

Растения выращивали в условиях постоянной освещенности (1000 люкс) при 24-25°, каллусные культуры культивировали в темноте при 26-28°.

Селекция трансгенных растений велась по способности к росту на средах с канамицином (100 мкг/мл), который в норме токсичен для клеток высших растений.

**Результаты и обсуждение.** В некоторых непатогенных микроорганизмах, в том числе *B.subtilis*, синтезируются 3 типа  $\beta$ -D-фруктофуранозидаз: сахараза (продукт гена *sacA*) [9], левансахаразы (продукт гена *sacB*) [8] и леваназы (продукт гена *sacC*) [7]. Последний является дистальным геном сложного оперона, включающего также гены *levD*, *levE*, *levG*.

Леваназа имеет молекулярный вес 73 кДа, ее синтез индуцируется небольшим количеством фруктозы по сложному, не понятному до конца механизму, включающему фруктозоспецифическую фосфоенолтрансферазную систему. Леваназа гидролизует не только сахарозу и леваны, но и инулин - запасной полисахарид ряда растений, в том числе и топинамбура.

Для экспрессии бактериальных генов в растениях клонирование вышеуказанного гена необходимо было осуществить под контролем промотора эукариотического типа (октопинсинтазного, нопапинсинтазного). Поэтому нами был использован вектор pAP2034 [13]. Он содержит изолированный из Т-ДНК дуальный промоторный фрагмент 1'-2' октопинового типа величиной 479 пар оснований (п.о.). Один из разнонаправленных промоторов этого фрагмента (2') в растительных клетках определяет транскрипцию бактериального гена неомицинфосфотран-

сферазы (NPT II), кодирующего устойчивость к канамицину и используемого благодаря этому в качестве маркера для отбора растительных трансформантов. Сразу же вслед за другим промотором I' находятся уникальные сайты Sal I и Bam HI, по которым и клонировался ген sacC. 3'-Нетранскрибируемая область гена g7 обуславливает полиаденидирование чужеродных последовательностей.

Переклонирование sacC гена из донорной плазмиды rIPS на вектор pAP2034 осуществляли следующим образом. На первом этапе работы предварительно переклонировали в плазмиду pUC7 [11] Pst I-Bam HI фрагмент структурной части sacC гена с последовательностью, содержащей собственный участок связывания рибосом (Шайн-Дальгарно); это было необходимо для того, чтобы указанная последовательность оказалась между сайтами Bam HI и Sal I полилинкера pUC7. Для этого ДНК плазмид rIPS и pUC7 обрабатывали в отдельности эндонуклеазами рестрикции Pst I и Bam HI. Для плазмиды pUC7 осуществляли недорестрикцию по Bam HI сайту, поскольку полилинкер pUC7 несет два Bam HI сайта. Рестрицированные ДНК смешивали в объеме 20 мкл (конечная концентрация ДНК - 150 мкг/мл) и сшивали с помощью ДНК-лигазы (1 ед.). В процессе лигирования происходит соединение Pst I - Bam HI фрагмента rIPS, величиной 2,4 тысяч пар оснований (т.п.о.), с плазмидой pUC7, раскрытой по Pst I и Bam HI сайтам.

Лигированной смесью трансформировали клетки реципиентного штамма *E.coli* TG1 [3]. Трансформанты с искомой рекомбинантной плазмидой, содержащей sacC в векторе pUC7, отбирали на L-агаре с добавлением 100 мкг/мл ампициллина (маркер pUC7), 0.1 мМ IPTG (изопропилтио-β-D-галактозид) и 40 мкг/мл X-gal (5Br-4Cl-3-индолил-β-D-галактозид - аналог лактозы). Плазида pUC7 содержит N-концевую часть гена lac Z *E.coli*, которая экспрессирует α-пептид β-галактозидазы [11]. α-Пептид способен комплементировать мутацию lac M15 хромосомы хозяйского штамма TG 1, что обуславливает синтез функциональной β-галактозидазы. Клонирование фрагментов ДНК в полилинкере перед структурной частью α-пептида приводит к его инактивации. На средах с индуктором β-галактозидазы IPTG и ее хромогенным субстратом X-gal штамм TG-1, трансформированный вектором pUC7, дает синие колонии, а трансформированный pUC7, несущим инсерцию в полилинкере, - белые. Отбор искомых трансформантов проводили также параллельным высевом лигированной смеси на минимальной среде M9 [3] с сахарозой и ампициллином.

Из отобранных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и подвергали рестрикционному анализу, который указал на присутствие в них наряду с векторной ДНК pUC7 дополнительных фрагментов, соответствующих ожидаемому размеру гена sac C (рис.1).

Для доказательства того, что нами клонирован именно 2,4 т.п.о. Pst I-Bam HI, а не 2,7 тпо Bam HI - Bam HI фрагмент с sacC, мы сравнили размеры рестриктов, полученных по Sal I и XmaI сайтам, с рестриктами

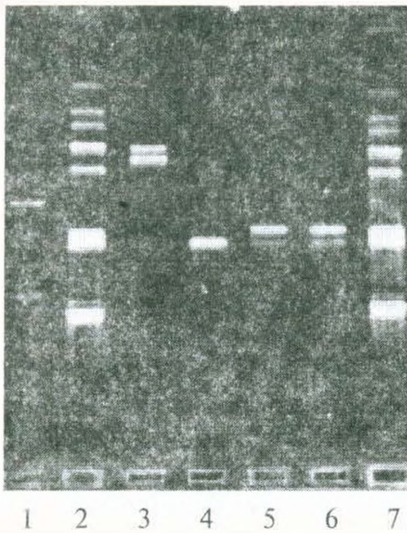


Рис. 1. Электрофореграмма рестрицированных плазмидных ДНК.

1. pUC7::sacC нативная;
2. I/PstI контроль;
3. pUC7::sacC/BamHI;
4. pUC7::sacC/Sal I и PstI;
5. pUC7::sacC/PstI и XmaI;
6. pUC7::sacC/SalI и XmaI;
7. I/PstI контроль.

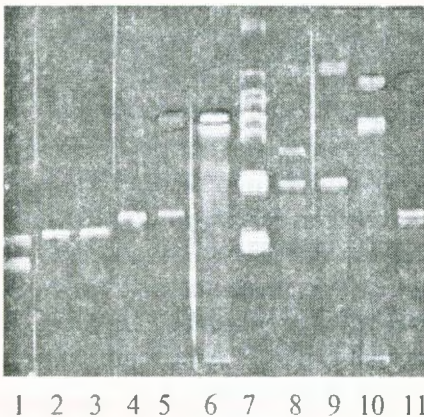


Рис. 2. Электрофоретическое разделение плазмидных рестриктвов.

1. pAP2034::sacC нативная;
2. pAP2034::sacC/Sal I;
3. pAP2034::sacC/Bam HI;
4. pAP2034/Bam HI;
5. pAP2034::sacC/Bam HI и Sal I;
6. pUC7::sacC/Bam HI и Sal I;
7. I/PstI контроль;
8. pAP2034: sacC/ PstI;
9. pAP2034/PstI;
10. pUC7::sacC/XmaI и Bam HI;
11. pAP2034::sacC/XmaI и Bam HI.

по сайтам Pst I и Xma I. Если бы образовались фрагменты с разницей в 0,3 т.п.о. (0,95 т.п.о. в первом случае и 0,65 т.п.о. во втором), то это свидетельствовало бы о присутствии в плазмиде pUC7 Bam HI-Bam HI фрагмента. А у нас образовались примерно одинаковые фрагменты размером около 5 т.п.о., что соответствует весу искомой рекомбинантной молекулы (рис.2).

Этот предварительный этап позволил на следующей стадии легко переклонировать ген из pUC7 уже на вектор pAP2034 по сайтам Bam HI и Sal I в правильной и единственно возможной ориентации. Для этого ДНК-плазмиды pUC7 : : sac C и pAP2034 расщепляли по Bam HI сайтам, затем рестрикты сшивали с помощью ДНК-лигазы и лигированной смесью трансформировали клетки *E.coli* штамма HB101 [3]. Трансформанты отбирали на селективной среде с ампициллином и стрептомицином, а также на минимальной среде M9 с необходимыми добавками для штамма HB101. Из предполагаемых трансформантов также выделяли ДНК и подвергали ее рестрикционному анализу, который показал, что сконструированная плазмида состоит из полного вектора pAP2034 (8 т.п.о.) и дополнительного Sal I-Bam HI фрагмента (2,4 т.п.о.) (рис.2).

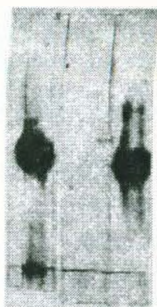
Представленные данные однозначно свидетельствуют о том, что полученная нами конструкция pAP2034 : : sacC, названная pAPL, содержит химерный ген промотор I'- sacC -

polyAg7. Промотор I' и polyAg7 функциональны в растениях и обеспечивают вставленную между ними последовательность ДНК (в данном случае sacC) сигналами инициации транскрипции и полиаденилирования.

Плазмида rAPL была использована в дальнейшем для трансформации клеток *A.tumefaciens* C58CI. Выбор данного штамма обусловлен следующим: он содержит обезоруженную плазмиду pGV3850, у которой онкогены Т-ДНК нопаинового типа были заменены последовательностями pBR322. Присутствие последовательностей pBR322 в составе pGV3850 делает этот вектор универсальным акцепторным вектором: любой ген, клонированный в плазмиде pBR322 или ее производных (каковой и является конструкция rAPL), может быть легко вставлен между последовательностями Т-ДНК за счет гомологичной рекомбинации с образованием плазмидных коинтеграгов [1].

Введение плазмидной ДНК rAPL в клетки *A.tumefaciens* проводили как методом прямой трансформации [1], так и электропорацией. Агробактериальные клоны, содержащие pGV3850 х rAPL, отбирали на селективных средах со стрептомицином, спектиномицином, рифампицином, ампициллином.

Наличие гена sacC в этих клетках подтверждено также блот-гибридизацией по Саузерну рестрицированной тотальной ДНК из отобранных клонов с зондом - последовательностью sacC плазмиды rAPL (рис.4).



1 2 3

**Рис. 3.** Авторадиограмма агробактериальных ДНК, гибридизирующихся с <sup>32</sup>P-ДНК плазмиды rAPL.

1. ДНК rAPL; 2. ДНК нетрансформированных агробактерий;

3. ДНК агробактериальных трансформантов.



**Рис. 4.** Этиолированное растение топинамбура на среде с канамицином.

Перенос гена sacC в топинамбур проводили методом "листных дисков" полученными трансформированными агробактериальными клетками.

Селекция трансформированных растений велась по способности к росту на средах, содержащих канамицин (100 мкг/мл), который в норме токсичен для клеток высших растений. Агробактерии удаляли путем обработки антибиотиком цефотаксимом (500 мкг/мл), который не токсичен

для растительных клеток.

На 6-7 день инкубации устойчивые к канамицину растения этиолировались. Наблюдаемое явление альбинизма вызвано, возможно, нарушением генетического аппарата растений (рис.4), что могло быть следствием интеграции рекомбинантной конструкции в геном топинамбура. Изучение физиолого-биохимических особенностей растений несущих, по всей вероятности, ген *sac C*, продолжается.

Выполненная работа частично финансировалась за счет гранта Ассоциации ИНТАС ЕС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гловер Л.М. Клонирование ДНК. Методы. М., 1988.
2. Гассер Ч.С., Фрейли Р.Т. Трансгенные культурные растения. В мире науки, 8, 24-30, 1992.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М., 1981.
4. Пирюзян Э.С., Андрианов В.М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.
5. Birnboim H.C., Doly J. NAR, 7, 1513-1523, 1979.
6. De Block Mare, Herrera-Estrella L., Van Montagu M et. al. EMBO. J., 3, 8, 1681-1689, 1984.
7. Kunst F., Lepesant J.-A. and Dedonder R. Biochimie, 168, 59, 287-292, 1977.
8. Lepesant J.-A., Kunst F., Lepesant-Kejzlarova J. and Dedonder R. Mol. Gen.Genet., 118, 135-160, 1972.
9. Lepesant J.-A., Billault A., Keijlarova-Lepesant J., Pascal M., Kunst F. and Dedonder R. Biochimie, 56, 1465-1470, 1974.
10. Mandel M., Higa A. J.Mol.Biol., 53, 154, 1970.
11. Messing J., Viera J. Gene, 19, 259, 1982.
12. Murachige T., Skoog F. Plant. Physiol., 15, 473-497., 1962.
13. Velten J., Schell J. Nucleic Acids Res., 13, 6981-6998, 1985.
14. Zambryski P., Joos H., Genetello C. EMBO J., 2, 2143-2150, 1983.

Поступила 12.XII.1997