

**СТВОРЕННЯ КОНСТРУКЦІЙ З САЙТ-СПЕЦИФІЧНОЮ РЕКОМБІНАЗНОЮ СИСТЕМОЮ CRE/loxP ПІД КОНТРОЛЕМ 35S ПРОМОТОРУ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ТРАНСФОРМАНТІВ *ARABIDOPSIS THALIANA*, ВІЛЬНИХ ВІД МАРКЕРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ**

**А.С. Секан, здобувач, С.В.Ісаєнков, кандидат біологічних наук  
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України**

*Представлені результати використання векторних ДНК-конструкцій що містять у своєму складі сайт-специфічну рекомбіназну систему Cre/loxP, для трансформації Arabidopsis thaliana. Показано ефективність використання даного підходу для отримання трансформантів, вільних від маркерних послідовностей.*

***Ключові слова:** Сайт-специфічна рекомбіназна система Cre/loxP, генетична трансформація, молекулярно-генетичний аналіз, експресія привнесених генів.*

При створенні трансгенних рослин використовують різні селективні системи для відбору трансформованого матеріалу. Селективними системами є послідовності ДНК, що кодують стійкість проти певних антибіотиків чи гербіцидів, є в геномі рослини та відповідні агенти, що присутні в селективному середовищі. Гени, що кодують стійкість проти антибіотиків, використовуються для швидкої та ефективної селекції трансформованих клітин чи тканин від нетрансформованих. Одним з прикладів селективної системи є канаміцин та споріднені аміноглікозидні антибіотики, які впливають на метаболізм клітини шляхом інгібування трансляції білків [3, 7]. У присутності гена *nptII*, що кодує неоміцин-фосфотрансферазу, відбувається фосфорилування цих антибіотиків [5]. На сьогодні генів стійкості проти

антибіотиків чи гербіцидів (селективні маркерні гени, СМГ) налічується понад 50 [15]. Після завершення відбору трансформованого матеріалу необхідність в експресії селективних маркерних генів відпадає. Проте під час подальшого практичного використання ГМ рослин виникає загроза потрапляння СМГ від трансформантів до дикорослих родичів. Розроблення генетично інженерних методів, за допомогою яких можливо уникнути потрапляння СМГ у навколишнє середовище, є важливою передумовою безпечної комерціалізації генетично-модифікованих сортів рослин.

Серед розроблених стратегій видалення СМГ з геномів сільськогосподарських сортів найбільшою популярністю користується сайт-специфічна технологія. Сайт-специфічна рекомбіназна система вперше була відкрита у бактерій та у дріжджів. Сайт-специфічна рекомбінація відбувається в районі специфічної послідовності ДНК чи сайту розпізнавання. Це призводить до розщеплення чи з'єднання цільових послідовностей в результаті інтеграції, делеції чи інверсії фрагментів ДНК без набуття чи втрати нуклеотидів [6, 14]. Сайт-специфічна рекомбіназна система *Cre/loxP* виділена з бактеріофага P1. Рекомбіназа Cre належить до родини тирозинових інтеграз. Система складається з двох коротких ДНК послідовностей *loxP* (locus of crossing-over) та гена рекомбінази Cre. В геномі *E.coli* ця система відповідає за перетворення двох плазмід фага P1 в мономерну одиницю шляхом рекомбінації між двох *lox* сайтів [10]. Для створення генетично модифікованих рослин, вільних від СМГ, було розроблено новий підхід використання сайт-специфічної рекомбіназної системи *Cre/loxP* під контролем 35S промотору з вірусу мозаїки кольорової капусти (CaMV). Запропонований підхід передбачає швидку та ефективну трансформацію рослини, не потребуючи при цьому присутності додаткових агентів чи специфічних умов зовнішнього середовища.

Метою нашого дослідження було вивчення ефективності трансформації рослин *Arabidopsis thaliana* за допомогою нового підходу у використанні сайт-специфічної рекомбінази *Cre/loxP*.

**Матеріали та методи досліджень.** Для розробки ефективної системи трансформації рослин *A. thaliana* з використанням сайт-специфічної рекомбінази Cre/loxP для отримання трансгенних ліній, вільних від маркерних послідовностей, створили відповідні векторні конструкції pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC. Різниця в будові конструкцій полягала в порядку розташування генів у трансформуючій касеті. Обидві ДНК-конструкції містили такі послідовності, як ген рекомбінази *cre*, репортерний ген *gus*, ген стійкості до гігromіцину *nptII*, що обмежувались сайтами ексцизиї *loxP*, та термінуюча послідовність нопалін-синтази (*nos*). У кожній із створених векторних конструкцій ділянка з селективними маркерними генами *gus* і *nptII* та геном самої рекомбінази обмежувалась сайтами ексцизиї. Ген стійкості проти антибіотика гігromіцину *hptII* був винесений за межі сайтів ексцизиї для селективного добору трансформованих рослин.

Створені векторні конструкції переносили до бактерій *Agrobacterium tumefaciens* штам GV3101 за допомогою електропорації [13]. Суспензію *A. tumefaciens* нарощували в рідкому середовищі Лурія-Бертоні [17] у присутності канаміцину (100 мг/л) впродовж 48 год при температурі 28<sup>0</sup> С на орбітальному шейкері (180 об/хв). Культуру бактерій осаджували при 4000 об/хв протягом 5 хв та суспендували в розчині солей Мурасіге та Скуг, 5%-ної сахарози, MES ("Sigma", США) та манітолу ("Sigma", США). Щільність суспензії при оптичній густині 600 нм становила 0,8.

В експериментах з трансформації використовували дикий тип *A. thaliana* екотипу *Columbia*. Для одночасного проростання насіння інкубували в темряві при температурі 4<sup>0</sup> С протягом двох діб, після цього висаджували в ґрунт та вирощували за тепличних умов. Для трансформації рослин використовували метод квіткового занурення в агробактеріальну суспензію [2]. За декілька днів до трансформації в рослин видаляли первинні суцвіття для стимуляції розвитку вторинних. Інокуляцію здійснювали шляхом занурення квіткових бруньок та квіток у бактеріальну суспензію на 1–2 хв. Рослини витримували 12 год у темряві за умов підвищеної вологості та згодом вирощували протягом чотирьох

тижнів за тепличних умов до моменту дозрівання насіннєвого матеріалу. Для подальшої роботи насіння стерилізували за методом вакуумного оброблення з додаванням до ексикатора суміші гіпохлориту натрію та 1М соляної кислоти у співвідношенні 3:1 протягом 4 годин та пророщували на селективному середовищі Мурасіге і Скуга [12] у присутності гігromіцину (100 мг/л). Для подальшої роботи добирали лише рослини, стійкі проти селективного агента гігromіцину.

Для встановлення експресії привнесених генів у геномі трансформантів *A. thaliana* проводили гістохімічний аналіз за допомогою GUS-тесту на 10 – 12-денних проростках. Для аналізу відбирали по 8 зразків кожної лінії трансформантів. Рослинний матеріал інкубували в реакційній суміші з 0,2 М фосфатом натрію, рН 7,0, 10 мМ ЕДТА, 20% метанолом, 0,01% Triton X-100, 2% ДМСО та 0,1% 5-бром-4-хлор-3-індол β-глюкопіранозидом (X-Gluc) при температурі 37<sup>0</sup> С протягом 2–3 год [8]. Після інкубації тканини промивали у 70%-ному спирті для видалення хлорофілу.

Для аналізу отриманих трансформантів за допомогою ПЛР виділяли геномну ДНК з двохтижневих рослин [4]. Для цього рослинний матеріал гомогенізували в екстракційному буфері (200 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 250 мМ NaCl, 25 мМ ЕДТА та 0,5% ДДС-натрію). Після осадження бруду супернатант преципітували ізопропанолом та відмивали у 70%-ному спирті. Сухий залишок ресуспендували у 50 мкл дистильованої води. Чистоту виділеної ДНК оцінювали за допомогою електрофорезу в 0,8%-ному агарозному гелі з флуоресцентним барвником бромистим етидієм (5 мкг/мл).

Для ПЛР змішували 2 мкл розчиненої ДНК, 10 мкМ праймерів (в об'ємі 0,5 мкл), 250 мкМ суміші дНТФ, 250 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3 одиниці Taq-полімерази («Sigma», США) та десятикратний розчин буфера ПЛР («Sigma», США) до кінцевого об'єму 25 мкл. Для ампліфікації ДНК використовували праймери: *hptII*F2 (віджиг до 3'-кінця гена *hptII*) 5'-CACAGTTCTCGTCCACAGTTCG-3' і 35StermRevAvrII (олігопослідовність, комплементарна 3'-кінцю 35S промотора) 5'-aaacCTAGGGATCTGGATTTTAGTACTGG-3'. Розмір продуктів ампліфікації

становив 300 п.н. Наявність продуктів ампліфікації за цією парою праймерів має свідчити про присутність Т-ДНК в геномі.

Подію ексцизії за допомогою рекомбінази Cre *loxP*-обмеженої ділянки визначали, використовуючи іншу пару праймерів в аналогічній суміші ПЛР: pRI-vecprobe1 (послідовність, комплементарна до векторної послідовності pORE) 5'-CACTCGATACAGGCAGCCCA-3' та pRI-vecprobe2 5'-GAATCTTGGCCTGCACGAATACC-3'. Розмір продуктів ампліфікації становив 1800 п.н. Обидві реакції проводили за умов: початкова денатурація при температурі 94<sup>0</sup> С - 2 хв; ампліфікація – 30 циклів (92<sup>0</sup> С – 30 с, 60<sup>0</sup> С – 30 с, 72<sup>0</sup> – 90 с), кінцева елонгація – 72<sup>0</sup> С протягом 5 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 2%-ному агарозному гелі з додаванням бромистого етидію.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Для визначення найбільш ефективного варіанта векторної конструкції для проведення генетичної трансформації рослин було створено дві конструкції із сайт-специфічною рекомбіназною системою CRE/*loxP* під контролем 35S промотора (рис. 1). Як вже зазначалось вище, обидві конструкції pORE-*lox1HGC* та pORE-*lox2HGC* - містили однаковий набір генів, але різниця між ними полягає в їх розташуванні на касеті.

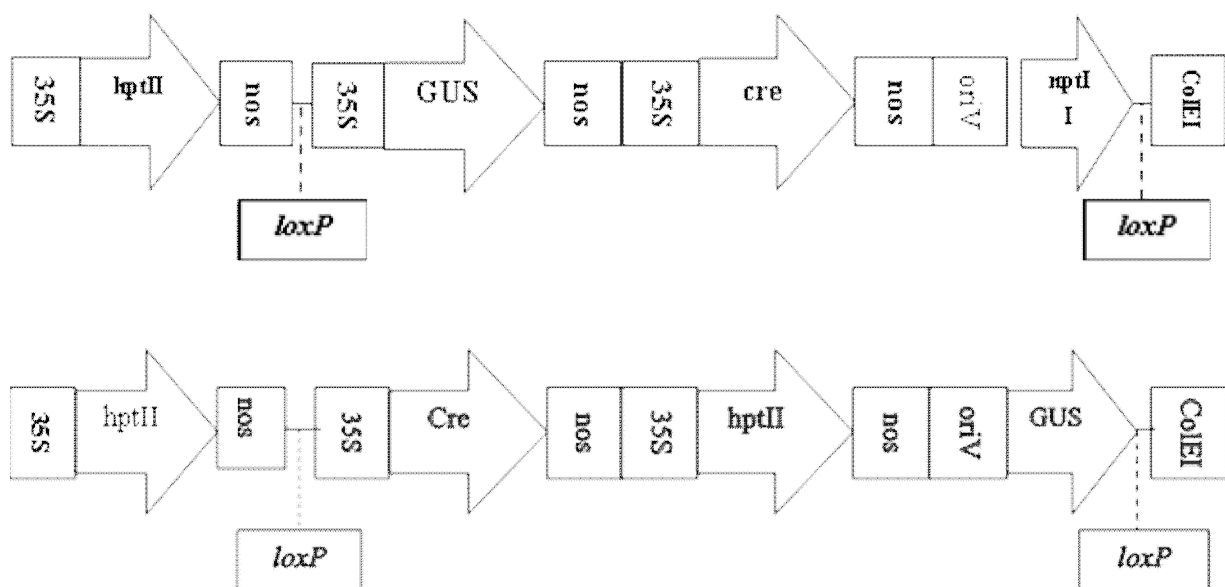


Рис. 1. Схема розташування генів у ДНК-конструкціях pORE-*lox1HGC* та pORE-*lox2HGC*. До складу конструкцій входить: 35S-промотор, ген *hptII*, pos-

термінатор, GUS – ген глюкуронідази, *cre* – ген рекомбінази, *oriV* – сайт початку ініціації реплікації, ген *nptII*, ColEI – послідовність, що відповідає за реплікацію плазмід у бактеріях *E. coli*.

Для забезпечення експресії Т-ДНК в геномі трансформантів нами було використано 35S промотор [18]. У ряді інших робіт описано використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*loxP* під контролем тканинспецифічних промоторів та промоторних послідовностей, ідентифікованих у складі генів теплового шоку. Зокрема, для регуляції роботи системи Cre/*loxP* використовують промотор, ідентифікований в зародкових тканинах [10], або індукцйбельний промотор до гена теплового шоку HSP81-1 [11]. Проте недоліком використання таких послідовностей є необхідність створення специфічних умов для проведення трансформації, або ж залучення додаткових агентів для ініціації експресії самої рекомбінази. Застосування ж промотору 35S дозволяє спростити використання запропонованих конструкцій. При цьому послідовності 35S промотора та pos-термінатора є надійною регулюючою системою для контролю експресії Т-ДНК у рослинному геномі. Так, у дослідженнях Kim et al. [9] для трансформації арабідопсису за допомогою векторної конструкції з сайт-специфічною рекомбіназою Cre/*loxP* використовувались регулюючі послідовності промотора 35S та pos-термінатора. Послідовність маркерного гена *gus* розділялась та виносилась за межі сайтів ексцизії *loxP*. Під час події видалення ділянки ДНК, обмеженої сайтами, частини гена з'єднувались. Таким чином, наявність експресії гена *gus* свідчила про роботу ферменту. Однак при застосуванні такого підходу для отримання трансформантів, вільних від СМГ, залишається питання подальшої присутності маркерного гена в рослинному геномі. Також у результаті роз'єднання кодуєчої послідовності ДНК підвищується ймовірність виникнення ефекта мовчання генів. У запропонованому нами підході з використання сайт-специфічної рекомбіназної системи всі СМГ, обмежені сайтами ексцизії, видаляються повністю.

Для визначення трансформаційної ефективності обох сконструйованих векторів була здійснена трансформація рослин арабідопсису за методом квіткового занурення. Завдяки винесенню за межі сайтів ексцизиї гена *hptII* можна було здійснювати селективний добір трансформантів за стійкістю до гігromіцину. Насіння пророщували на селективному середовищі з антибіотиком. За схожістю насінневого матеріалу було виявлено високу частоту подій трансформації для кожної конструкції.

Функціонування T-ДНК у геномі визначали шляхом проведення гістохімічного аналізу на наявність GUS-активності (рис. 2). У результаті проведених експериментів було встановлено, що використання 35S промотора забезпечує експресію маркерного гена на високому рівні. Оскільки послідовності маркера та ферменту знаходяться в межах сайтів ексцизиї, можна припустити, що експресія генів *gus* та *cre* є на одному рівні. При трансформації ДНК-конструкцією pORE-lox1HGC забарвлення за GUS-тестом відбулось у 78% трансгенних рослин. Після трансформації з використанням конструкції pORE-lox2HGC кількість позитивно забарвлених за GUS трансгенних ліній становила 85% від загальної кількості трансформантів. Використовуючи ДНК-конструкції із сайт-специфічною рекомбіназною системою *Cre/loxP* під контролем 35S промотора було отримано рослини із стабільною експресією T-ДНК. Всього проаналізовано насіння від 60 трансформованих рослин (покоління T<sub>0</sub>). Для порівняння, у роботі Chong-Pérez et al. [1] для отримання трансформованих рослин банану, вільних від СМГ, у векторних конструкціях використовувалась сайт-специфічна рекомбіназна система *Cre/loxP* під контролем індукцибельних промоторів теплового шоку Gm*hsp17.6-L* та HSP18.2. Експресія рекомбінази в рослинах, трансформованих тією чи іншою конструкцією, відбувалась після індукції теплового шоку. В результаті частота видалення *loxP*-обмежених ділянок була визначена як 59,7% та 40% відповідно. У роботі Zuo et al. [16] для трансформації рослин арабідопсису використовувалась рекомбіназна система *Cre/loxP* під контролем промотору естрогенового рецептора та в межах спеціально сконструйованої системи XVE.

Ексцизія ділянок ДНК, обмежених сайтами ексцизії, відбувалась в присутності хімічного агента  $\beta$ -естрадіолу. Подія ексцизії була встановлена у 66%.

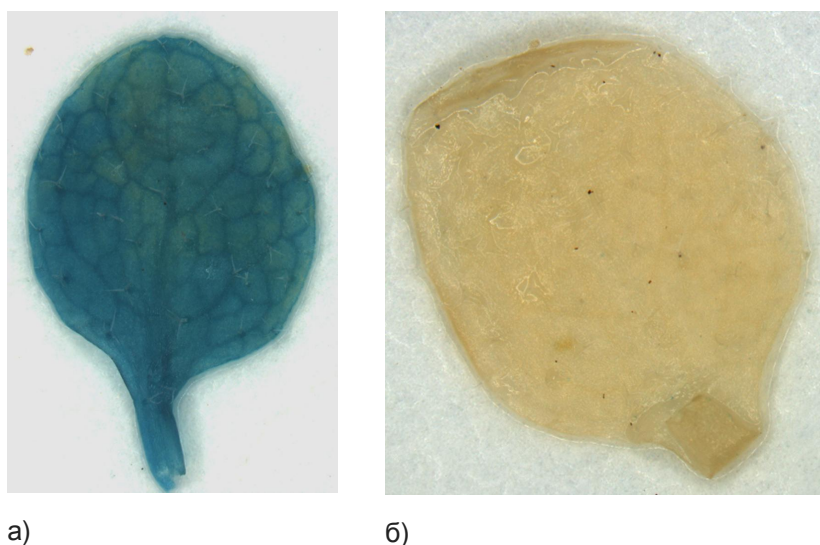


Рис. 2. Експресія гена *gus* у трансформованих рослинах *A. thaliana*: а - зразок з позитивним результатом за GUS-тестом; б - зразок з негативним результатом за GUS-тестом.

Для підтвердження події трансформації проводили ПЛР-аналіз геномної ДНК. У реакції використовували праймери до 35S промотора та гена *hptII*, розміщені поза межами сайтів ексцизії *loxP* та пара праймерів до гена *nptII*. У результаті проведеного аналізу виявлено присутність ділянки Т-ДНК конструкції  $\text{pORE-lox}^1\text{HGSC}$ , обмеженої *loxP* сайтами, у 80% зразків. Кількість рослин, трансформованих з використанням ДНК-конструкції  $\text{pORE-lox}^2\text{HGSC}$  з продуктами ампліфікації до частин Т-ДНК, обмеженої сайтами ексцизії, становить 87% від загальної кількості. Кількість рослин, трансформованих  $\text{pORE-lox}^1\text{HGSC}$ , в яких відбулась подія ексцизії, становила 10%, а у трансформантів за  $\text{pORE-lox}^2\text{HGSC}$  - 12% від загальної кількості трансформантів (рис. 3). Різниця між результатами гістохімічного аналізу на GUS-активність та молекулярно-генетичним аналізом вказує на ефект мовчання генів (рис. 4).



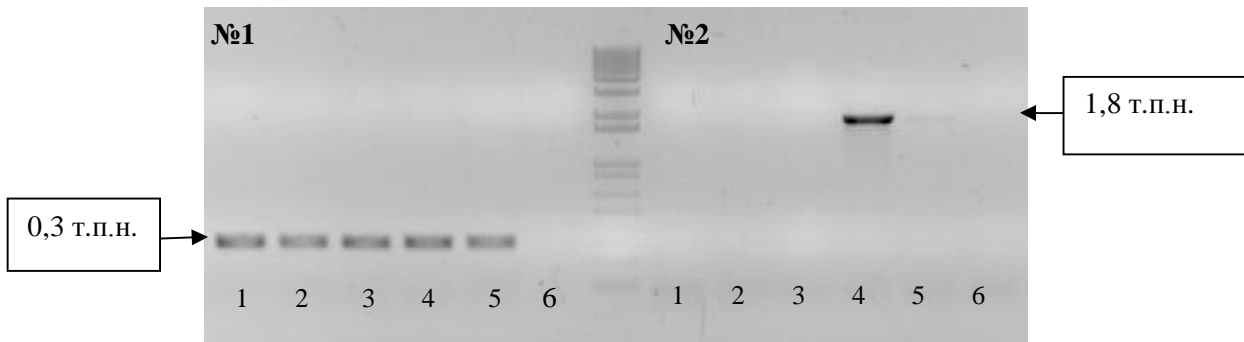


Рис. 3. Результати ПЛР-аналізу видалення маркерних послідовностей рекомбіназою *Cre* (в 0,8%-ному агарозному гелі) в рослинах, трансформованих вектором *pORE-lox2HGC*: зразки 1-5 – продукти ампліфікації, що вказують на присутність Т-ДНК в геномі, «6» - негативний контроль,  $H_2O$ . №1 – перевірка присутності ДНК конструкції в рослинному геномі (праймери до 35S промотору та *nptII*), розмір продукту 0,3 т.п.н., №2 – рослини з видаленими послідовностями ДНК, обмеженими сайтами *loxP* (праймери до гена *nptII* у межах сайтів ексцизії), розмір ампліконів 1,8 т.п.н. (відсутність продукту ампліфікації вказує на те, що подія ексцизії за сайтами *loxP* в геномі зразка відбулась).

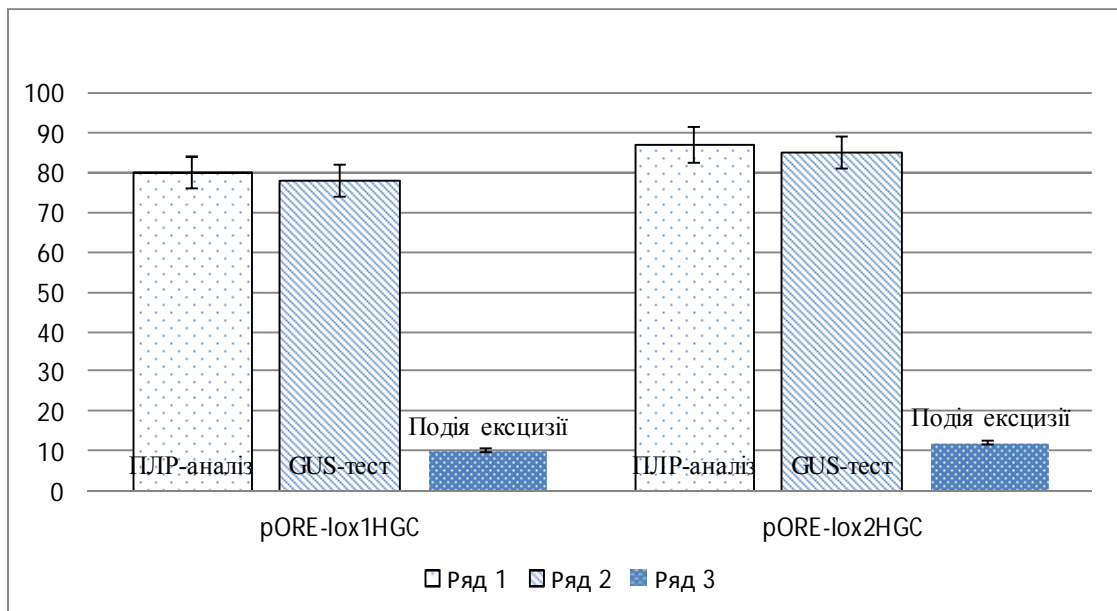


Рис. 4. Порівняння результатів гістохімічного та молекулярно-генетичного аналізів трансформованих рослин арабідопсису за допомогою векторних конструкцій *pORE-lox1HGC* та *pORE-lox2HGC*. Схематичне

зображення різниці між детектованою за допомогою ПЛР присутністю Т-ДНК в геномі, експресією гена *gus* та подіями видалення з геному *loxP* обмежених ділянок Т-ДНК за допомогою рекомбінази Cre.

### **Висновки**

1. У результаті проведеної роботи продемонстровано ефективне використання нового підходу для отримання трансгенних ліній рослин.

2. Проаналізовано ефективність використання ДНК-конструкцій, створених для отримання трансформантів, вільних від маркерних послідовностей. За допомогою проведеного гістохімічного та молекулярно-генетичного аналізів геному трансформантів відзначена стабільна експресія Т-ДНК в рослинах трансформованих обома типами ДНК-конструкцій.

3. Виявлено подію ексцизії ділянок ДНК, обмежених сайтами ексцизії *loxP*, що вказує на експресію рекомбінази Cre. Вважається, що в наступних поколіннях трансформантів частота подій видалення ділянок ДНК з селективними маркерними генами буде підвищуватись.

4. Запропонований підхід з використанням розроблених векторних конструкцій дає змогу спростити процес отримання трансформованих рослин, вільних від селективних маркерних послідовностей. Методика отримання трансформантів з використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*loxP* є простою та не вимагає проходження додаткових етапів для активації роботи рекомбінази. Цей підхід можна ефективно застосовувати для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від маркерних послідовностей з метою спрощення подальшого процесу комерціалізації.

### **Список літератури**

1. Chong-Perez B. Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system./B. Chong-Perez, R.G. Kosky, M. Reyes, [et. al.] // J Biotechnol. – 2012. – Vol.159, No.4. – P. 265 – 273.

2. Clough J. S. Floral dip: simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / J.S. Clough, F.A. Bent // *Plant J.* – 1998. – Vol. 16, No. 6. – P. 735–743.
3. Darbani B. Methods to produce marker-free transgenic plants./ B. Darbani, A. Eimanifar, Jr. C.N. Stewart // *Biotechnol. J.* – 2007. – Vol. 2. – P. 83–90.
4. Dellaporta S. L. A plant DNA miniprep: version II./ S.L. Dellaporta, J.Wood, J.B. Hicks // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – Vol. 1. – P. 19–21.
5. Goodin J. Transgenic plants: methods and protocols. /J. Goodwin, G. Pastori, M. Davey, H. Jones // *Methods Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 286. – P. 191–202.
6. Grindley N.D. Mechanisms of site specific recombination. / N.D. Grindley, K.L. Whiteson, P.A. Rice // *Annu Rev. Biochem.* – 2006. – Vol.75. – P. 567–605.
7. Herrera-Estrella L. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. /L. Herrera-Estrella, M. De Block, E. Messens [*et al.*] // *EMBO J.* – 1983. – Vol. 2. – P. 987–995.
8. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system./ R. A. Jefferson // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1987. – Vol. 5. – P. 387–405.
9. Kim H.-B. Development of a simple and efficient system for excision selectable markers in *Arabidopsis* using a minimal promoter::Cre fusion construct./H.-B. Kim, J.-I. Cho, N. Ryoo,[ *et al.*] // *Mol Cells.* – 2012. – Vol. 33, No.1. – P. 61 – 69.
10. Kopertekh L., Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco./ L. Kopertekh, K. Schulze, A. Frolov, [*et al.*] // *Plant Mol. Biol.* – 2010. – Vol.72. – P. 597–605.
11. Liu H.K. Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants./H.K. Liu, C. Yang, Z.W. Wei // *Plant Sci.* – 2005. – Vol.168. – P. 997–1003.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures./ T.Murashige, F. Skoog // *Phys Pla.* – 1962. – Vol.15, N3. – P. 473 – 497.
13. Sambrook J: *Molecular cloning: a laboratory manual.* / J. Sambrook // Cold Spring Harbor, N.Y.: - Cold Spring Harbor Laboratory 2001. – pp 2100.

14. Wang Y. Recombinase technology: applications and possibilities/ Y. Wang, Y.-Y. Yau, D. Perkins-Balding, J.G. Thompson // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol.30. – P. 267–285.
15. Yemets A.I. Modified tubulin genes as selectable markers for plant transformation Biotechnology [Eds. Blume Ya.B., Baird W.V., Yemets A.I., Breviario D.] // *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-*. – 2009. – P. 435-454.
16. Zuo J. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants./ J., Zuo, Q.W. Niu, S.G.Møller, N.H Chua. // *Nat Biotechnol.* – 2001. – Vol.19, No.2. – P. 157 – 162.
17. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. / Т. Маниатис, Е.Ф. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 521 с.
18. Секан А.С. Одноетапне отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей, за допомогою сайт-специфічної рекомбіназної системи *Cre/loxP* під контролем мінімального 35S промотору/ А.С. Секан, С.В. Ісаєнков // *Доп. НАН України.* – 2014. – Т.3. – С. 158 – 163.

**Development of DNA-Constructions with Site-Specific Recombinase System Cre/loxP Under the Control of a 35S Promoter for Transformation of Arabidopsis Thaliana to Produce Marker-Free Plants**

A.S. Sekan, S.V. Isaenkov

The results of the development the vector DNA-constructions with site-specific recombinase system *Cre/loxP* for agrobacterium transformation of *Arabidopsis thaliana* plants. It is showed the efficiency of using this approach for obtaining marker-free transformed plants.

**Key words:** *site-specific recombinase system Cre/loxP, genetic transformation, molecular genetic analysis, expression of the foreign genes.*

**Создание конструкций с сайт-специфической рекомбиназной системой Cre/loxP под контролем 35S промотора, а также их использование для получения трансформантов *Arabidopsis thaliana* без маркерных генов**

А.С. Секан, С.В. Исаенков

Представленные результаты использования векторных ДНК-конструкций, содержащих сайт-специфическую рекомбиназную систему Cre/loxP для агробактериальной трансформации *Arabidopsis thaliana*. Показано эффективность использования данного подхода для получения трансформантов, не содержащих маркерные последовательности.

**Ключевые слова:** сайт-специфическая рекомбиназная система Cre/loxP, генетическая трансформация, молекулярно-генетический анализ, экспрессия привнесенных генов.