

Литература

1. Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, K.J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. // *LWT – Food Sci. Technol.* – 2009. - 42, 448–457.
2. Tannock G.W. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. // *Curr. Issues Molec. Biol.* – 1999. - 1(1): 53-64.
3. Coudeyras S., Marchandin H., Fajon C., and Forestier Ch. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* Group // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2008. - Vol. 74(9). - p. 2679–2689
4. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology// *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* - 2002. - Vol.52. - p.1043–1047
5. Sato H., Torimura M., Kitahara M., Ohkuma M., Hottac Y., Tamura H. Characterization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in S10-spc-alpha operons as observed by MALDI-TOF MS. // *System. Appl. Microbiol.* - 2012. - Vol. 35. - p. 447–454
6. Claes I.J.J., Schoofs G., Regulski K., Courtin P., Chapot-Chartier M., Rolain T., Hols P., von Ossowski I., Reunanen J., de Vos W.M., Palva A., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J., Lebeer S. Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. // *PLoS One.* – 2012. – V.7. – Issue 2. – e31588.
7. Bäuerl C., Pérez-Martínez G., Yan F., Polk D.B., Monedero V. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23. // *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V.19. – P.231–241.
8. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» <http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/466/AmpliPrime-DNA-sorb-AM.MANUAL.27122012.pdf>
9. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator // *Nucl. Acids Res.* – 2007. – Vol. 35 (webserver issue): May 25.

УДК 577.218

Э.Р. Мальцева*¹, А.Ж. Исмагул², Г. Исакова², С. Лопато², С. Елибай², Н.А. Айтхожина¹

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы

²Австралийский центр функциональной геномики растений (АЦФГР), Австралия, г. Аделаида

*e-mail: elina_m@inbox.ru

Генетическая трансформация пшеницы транскрипционным фактором DREB3

Проведена биобаллистическая трансформация незрелых зародышей мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29. Получено 40 трансгенных растений- регенерантов поколения T₀, несущих ген пшеничного транскрипционного фактора DREB3. Наличие целевого гена подтверждено методом полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Ключевые слова: абиотические стрессы, транскрипционные факторы, DREB3, пшеница, генетическая трансформация.

E. Maltseva, A.Zh. Ismagul, G. Iskakova, S. Lopato, S. Eliby, N.A. Aitkhodzina

Wheat genetic transformation with DREB3 transcription factor

Biolistic transformation was carried out for immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) variety Saratovskaya 29. Forty transgenic plants – regenerants of T₀ generation with wheat DREB3 transcription factor gene were obtained. Presence of the target gene was proved by the method of polymerase chain reaction with specific primers.

Keywords: abiotic stress, transcription factors, DREB3, wheat, genetic transformation.

Э. Мальцева, А.Ж. Исмагул, Г. Исакова, С. Лопато, С. Елибай, Н.А. Айтхожина

DREB 3 транскрипциялық факторы арқылы бидайдың генетикалық трансформациясы

Жұмсақ бидайдың (*Triticum aestivum* L.) Саратовская-29 сортының толық дамымаған ұрықтарының биобаллистикалық трансформациясы жүргізілді. Бидайдың DREB3 транскрипциялық факторының генін тасымалдайтын T₀ ұрпағының 40 трансгенді регенерант өсімдіктері алынды. Мақсатты геннің бар екендігі спецификалық праймерлі полимеразалық тізбекті реакция әдісімен расталды.

Түйін сөздер: абиотикалық стресс, транскрипциялық факторлар, DREB3, жұмсақ бидай, генетикалық трансформация.

Абиотические и биотические стрессы отрицательно влияют на выживание, продукцию биомассы и урожайность растений. Растения обычно реагируют на изменения внешней среды с помощью комплексных механизмов адаптации, позволяющих приспособиться к определенным неблагоприятным условиям в строго определенное время. Эти механизмы связаны с целым рядом физиологических и биохимических изменений, включающих регуляцию фотосинтеза и транспирации листьев, уменьшение листовой поверхности, стимуляцию корневого роста, изменение содержания воды, изменение состава осмотиков, электролитов и т.д. При чрезмерном стрессе усиливается производство активных форм кислорода, и накопление свободных радикалов, которые нарушают клеточный гомеостаз, реагируя с липидами, белками, пигментами и нуклеиновыми кислотами, приводя к перекисному окислению липидов, повреждению мембран, инактивации ферментов, и таким образом негативно воздействуя на жизнеспособность клеток [1].

Одним из новых подходов к повышению устойчивости растений является их генетическая трансформация генами защитного ответа. Хотя показано, что трансформация растений отдельными структурными генами улучшает их устойчивость к стрессу, очевидно, что, возможно, более рациональным подходом к этой проблеме является повышенная экспрессия соответствующих транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, запускают синтез целого ряда противострессовых белков [2]. Одним из наиболее перспективных представителей этого семейства генов регуляторов можно назвать транскрипционные факторы группы DREB (dehydration responsive element binding). Исследования показывают, что повышенная экспрессия этих транскрипционных факторов активирует экспрессию целевых генов, содержащих в своих промоторах DRE-элементы (элементы ответа на обезвоживание), позволяя растениям эффективно противостоять стрессу [3, 4].

Наиболее изучено влияние данных транскрипционных факторов в обеспечении механизмов засухоустойчивости [5, 6, 7], однако некоторые исследования доказывают, что транскрипционные факторы DREB играют важную роль в обеспечении устойчивости к различным видам стрессов и демонстрируют перекрывающиеся ответы на разные стрессовые условия. Эти транскрипционные факторы контролируют экспрессию генов защитного ответа по АБК-независимому пути при абиотическом и биотическом стрессах [3].

Материалы и методы

Исходным материалом для трансформации служила мягкая пшеница *Triticum aestivum* сорта Саратовская 29. В качестве эксплантов использовались незрелые зародыши, взятые на 14 день после опыления, и высаженные на среду для получения эмбрионного каллуса.

Конструкция, содержащая ген DREB3, была создана сотрудниками АЦФГР. Для отбора растений, несущих целевую конструкцию, была проведена котрансформация с геном ацетогидроксиацетилсинтазы (AHAS), обеспечивающим устойчивость к гербицидам имидазолинонового ряда. Биобаллистическая трансформация была проведена согласно протоколу [8], с использованием биобаллистической установки Biolistic Particle Delivery System PDS-1000/He (Bio-Rad).

Отбор трансформированных каллусов проводился на селективной среде, содержащей гербицид имазетапир. Прошедшие селекцию каллусы были пересажены на регенерационную среду, содержащую зеатин и кинетин. Получившиеся растения были высажены в почву.

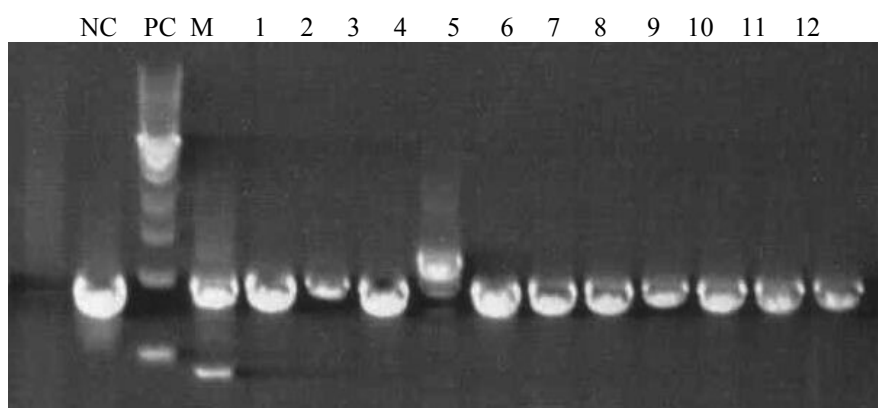
Для подтверждения вставки целевого гена из этих растений была выделена ДНК (с помощью набора Sigma EXTRACT-N-AMP-RED PLANT PCR KIT) и проведена ПЦР со специфическими праймерами (D3F1: 5'- AACAAAGAAGTCGCGCATCTGGCTCG; NTR1: 5'- AATCATCGCAAGACCGGCAACAGG).

Результаты и их обсуждение

В результате селекции каллусов, полученных при трансформации, на среде с гербицидом имидазолинонового ряда было получено 59 растений пшеницы. Из трансгенных растений поколения T₀ была выделена тотальная ДНК, которая использовалась для полимеразной цепной реакции с праймерами, специфичными к гену DREB3. Результаты полимеразной цепной реакции представлены на рисунке 1.

В качестве положительного контроля использовалась исходная конструкция, несущая ген DREB3, в качестве отрицательного – смесь для ПЦР, не содержащая ДНК.

Специфический ампликон размером 660 пар нуклеотидов подтверждает наличие гена DREB3, т.е. успешный перенос и интеграцию данного транскрипционного фактора, в 40 растениях.



NC – отрицательный контроль, PC – положительный контроль,
1-12 – ДНК пшеницы после ПЦР со специфическими к DREB3 праймерами

Рисунок 1 – Результаты электрофоретического разделения продуктов полимеразной цепной реакции

Тем не менее, для подтверждения правильной работы гена необходимо в будущем провести дополнительные исследования по определению белкового продукта гена, определению уровня синтеза регулируемых этим транскрипционным фактором белков, а также устойчивость или восприимчивость полученных растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Литература

- 1 Lata C., Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants // Journal of Experimental Botany. – 2011 – V. 62, No. 14. – P. 4731-4748.
- 2 Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – 1819. – P. 86-96.
- 3 Agarwal P., Agarwal P., Reddy M., Sopory S. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants // Plant Cell Reports. – 2006. – 25. P. 1263 – 1274.
- 4 Wang J. et al. Induced Expression of DREB Transcription Factor and Study on Its Physiological Effects of Drought Tolerance in Transgenic Wheat // Acta Genetica Sinica. – 2006. – 33(5). – P. 468-476.
- 5 Islam M.S., Wang M.H. Expression of dehydration responsive element-binding protein-3 (DREB3) under different abiotic stresses in tomato // BMB reports/ - 2009. – P. 611-616.
- 6 Zhao T. et al. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in Malus under abiotic stress // Molecular Genetic Genomics.- 2012. – No 287. - P.423-436.
- 7 Sazegari S., Niazi A. Isolation and molecular characterization of wheat (Triticum aestivum) Dehydration Responsive Element Binding Factor (DREB) isoforms // Australian Journal of Crop Science.- 2012.- 6 (6) – P. 1037-1044
- 8 Ismagul A., Iskakova G., Harris J., Eliby S. Biolistic Transformation of Wheat with Centrophenoxine as a Synthetic Auxin // Methods in Molecular Biology: Crop Breeding. -2013. - Humana Press, Springer.

УДК 577.113: 577.217

Д.А. Мухамедьяров, Ж.А. Куламетов, М.С. Калимкулова, И.А. Ахметоллаев*

Национальный центр биотехнологии, г. Астана, Казахстан

*e-mail: iliyas@mail.ru

Синтез модифицированных олигонуклеотидов для идентификации микросателлитных локусов крупного рогатого скота

Микросателлитные ДНК технологии, основанные на флуоресцентно-модифицированных олигонуклеотидах, на сегодняшний день являются наиболее информативными и эффективно применяемыми в популяционной и эволюционной биологии, геномном картировании и определении родства между видами и популяциями. В ходе проведенной работы нами были модифицированы по 5' концу 4 праймера для локусов BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60. Праймеры связанные с азидами флуоресцентных родаминов были очищены от свободных олигонуклеотидов и несвязанного флуоресцентного реагента на колонке C18 в системе ВЭЖХ. Полученные с помощью хроматографии фракции праймеров проанализированы по длине волны эмиссии флуоресцентного родамина.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, флуоресцентные метки, синтез, микросателлиты.