

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
5*10 ⁶	21,48±2,4	22,47±0,7	25,48±4,8	29,21±2,5
10*10 ⁶	20,05±1,1	21,00±1,3	23,0±1,3	29,27±0,1
<i>Dictyochlorella globosa</i>				
1*10 ⁶	18,01±0,9	20,09±3,1	22,01±2,9	24,1±2,4
5*10 ⁶	16,23±1,8	21,28±0,9	22,5±1,9	23,11±1,7
10*10 ⁶	16,67±1,9	21,56±1,5	21,9±2,2	22,62±2,8
<i>Scenodesmus obliquus</i>				
1*10 ⁶	15,3±1,1	14,01±0,9	17,10±1,4	19,30±0,7
5*10 ⁶	16,07±1,5	15,05±1,8	16,1±2,1	18,7±1,9
10*10 ⁶	15,58±0,5	14,11±0,6	15,3±1,1	17,4±2,1

Анализ результатов показал, что в динамике роста культур микроводорослей содержание общих липидов растет. Достоверной разницы в динамике накопления липидов при росте культур с разной начальной плотностью посева не выявлено.

Литература

- 1 Басова М.М. Жирнокислотный состав липидов микроводорослей. - Севастополь: ИБЮМ НАНУ, 2003. – С. 3-7.
- 2 Faroouqi A. A. et al. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvements in neurological disorders // Chem. Phys. Lipids. – 2000. – V. 106. № 1. – P. 1–29.
- 3 Назаров П.Е., Мягкова Г.И., Гроза Н.В. Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы // Вестник МИТХТ. – 2009. – Т. 4. № 5. - С. 3-19.
- 4 Пульц О. Ценные вещества из водорослей // Альгология. – 2000. – Т. 10. -№ 3. – С. 344-348.
- 5 Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка, 1975. - 245 с.
- 6 Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Тренкеншу Р.П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях минерального питания // Экология моря. – 2001. – Вып.56. – С. 41-46.
- 7 Тренкеншу Р.П., Геворгиз Р.Г., Боровков А.Б. Основы промышленного культивирования Дуналиеллы солонowodной (*Dunaliella salina* Teod.). – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. – 103 с.
- 8 KsanT.G., Zekerüyaoulu A.L., Ak I. The Growth of *Spirulina platensis* in Different Culture Systems Under Greenhouse Condition // Turk. J. Biol. – 2007. – № 31. – P. 47-52.
- 9 Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1957. – V.37. - №8. – P. 911-917

УДК 577.216.3, 577.218

А.М. Писаренко*, Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, Б.К. Искаков

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

*e-mail: alena_pisarenko@inbox.ru

Получение растений картофеля, экспрессирующих транскрипционный фактор AtDREB2A

Целью работы является получение трансгенных растений картофеля, экспрессирующих транскрипционный фактор AtDREB2A в нативной и мутированной формах, для изучения молекулярных механизмов устойчивости растений к засухе.

Аmplифицирован фрагмент ДНК, кодирующий ген транскрипционного фактора AtDREB2A из *Arabidopsis thaliana*, и проведен делеционный мутагенез кодирующей последовательности с целью получения конститутивно активного белка. Обе последовательности клонированы под контроль конститутивного 35S-промотора вируса CaMV и индуцибельного промотора rd29A, а также различных вариантов усилителей трансляции. Полученные трансгенные растения, экспрессирующие ген AtDREB2A в нативной и мутированной формах, были проверены на устойчивость к засухе.

Ключевые слова: фактор транскрипции, AtDREB2A, засуха, картофель.

A.M. Pisarenko, R.M. Nargilova, O.V. Karpova, B.K. Iskakov

Obtaining of potato plants that express transcriptional factor AtDREB2A

The aim of the work is to obtain of transgenic potato plants expressing transcriptional factor AtDREB2A, in intact and mutated form, for studying of the molecular mechanisms of plants resistance to drought.

The DNA fragment that encodes of gene for transcriptional factor AtDREB2A of *Arabidopsis thaliana* was amplified, and deletion mutagenesis of the coding sequence was made in order to obtain the constitutively active protein.

Both sequences are cloned under the control of constitutive 35S-promoter of virus CaMV and of inducible promoter rd29A, and also various enhancers of translation.

The gained transgenic plants, expressing gene AtDREB2A in native and mutated form, have been checked for a drought resistance.

Keywords: transcriptional factor, AtDREB2A, drought, potato.

А.М. Писаренко, Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, Б. Қ. Ысқақов

AtDREB2A транскрипциялық факторын экспрессиялайтын картоп өсімдіктерін алу

Жұмыстың мақсаты – өсімдіктердің қуаңшылыққа төзімділігінің молекулалық тетіктерін зерттеу үшін AtDREB2A транскрипциялық факторын табиғи және мутант түрінде экспрессиялайтын трансгенді картоп өсімдіктерін алу.

Arabidopsis thaliana-ның AtDREB2A транскрипциялық факторын генін кодтайтын ДНҚ бөлігі көбейтілді және оның кодтайтын тізбегіне конститутивті әрекетті белок алу мақсатында делециялық мутагенез өткізілді. Екі тізбек CaMV вирусының конститутивті 35S-промоторы мен индукцияланатын rd29A промоторы, және трансляция күшейткіштерінің әртүрлі варианттарының бақылауында клондалды.

Алынған AtDREB2A транскрипциялық факторын табиғи және мутант түрде экспрессиялайтын трансгенді өсімдіктердің қуаңшылыққа төзімділігі тексерілді.

Түйін сөздер: транскрипциялық фактор, AtDREB2A, қуаңшылық, картоп.

Транскрипционные факторы (ТФ) – это важные регуляторы, изменяющие экспрессию генов растений [1, 2] в зависимости от условий окружающей среды [3-6].

Среди многих ТФ заслуживают внимания факторы, отвечающие на дегидратацию растений в условиях засухи (DREB от *d*rought *r*esistance *e*lement *b*inding). DREB-белки относятся к семейству ERF/AP2 ТФ. Многие стресс-индуцируемые члены подсемейства DREB являются основными факторами, участвующими в ответе растения на абиотический стресс, регулируя экспрессию генов посредством связывания с *cis*-действующими DRE/CRT элементами, находящимися в промоторных областях индуцибельных генов [7]. Одним из промоторов, несущих DRE-элемент, является индуцибельный промотор гена *rd29A* [8]. Было показано, что использование индуцибельного промотора *rd29A* вместо конститутивного при создании трансгенных растений позволяет избежать проблем с последствиями чрезмерной экспрессии трансгенов [2, 9]. Белки DREB2A и DREB2B, активация которых происходит в условиях обезвоживания, повышенного засоления почв и теплового шока, являются примерами ТФ, которые способны связываться с DRE-элементом промотора *rd29A* посредством своего ДНК-связывающего домена [10, 11].

Экспрессия нативного гена *DREB2A* не сопровождалась какими-либо изменениями фенотипа растений или экспрессии подчиненных ему генов. Было предположено, что для этого белка требуется посттрансляционная модификация, необходимая для активации белка DREB2A. Действительно, при удалении серин- и треонин-богатой области из 30 аминокислот в центральном районе кодирующей последовательности этого гена, примыкающей к AP2/ERF ДНК-связывающему домену, происходил синтез каталитически активного белка DREB2A-CA [12-14].

Материалы и методы

Мы амплифицировали с помощью праймеров (таблица 1) два ДНК-фрагмента, первый из которых кодирует полную последовательность белка AtDREB2A из *Arabidopsis thaliana* Col-O (обозначен как *natAtDREB2A*). Второй ДНК-фрагмент (Δ *AtDREB2A*) кодирует конститутивно активную форму этого же белка с делецией размером в 30 аминокислотных остатков в центральном районе (позиции с 135 по 164 аминокислоты). В оба варианта гена *AtDREB2A* (нативный и делетированный) на 3'-конце кодирующей последовательности были вставлены кодоны, которые кодируют восемь гистидинов (8xHis-tag).

Таблица 1 – Праймеры, использованные для проведения ПЦР

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера
<i>Nco</i> I + DREB2A (sense)	5'-GGGAAGGCCATGGCAGTTTATGATCAG-3'
<i>Sa</i> II + DREB2A (antisense)	5'-GTTTTGTTTAGTTGTCGACATCCAAGTAAC-3'
DREB2A-mut-sense	5'-GAGCGTCTTAATTTCCCTGATCCAGATTGTGAA-3'
DREB2A-mut-antisense	5'-TTCACAATCTGGATCAGGGAAATTAAGACGCTC-3'

Клонирование генов *natAtDREB2A* и $\Delta AtDREB2A$ в векторе для трансформации растений.

Кодирующие последовательности *natAtDREB2A* и $\Delta AtDREB2A$ клонировали в агробактериальный бинарный вектор pCAMBIA2300 под контроль конститутивного промотора 35S *CaMV* или индуцибельного промотора *rd29A*. Трансгенные конструкции содержали так же различные варианты энхансеров – 5' нетранслируемую последовательность (НТП) Y вируса картофеля или «3xARC» – синтетическую последовательность размером в 45 н., комплементарную 18S рРНК в положении с 1115 по 1131 н. На 3' конце к последовательности гена нами была присоединена 3'-НТП вируса табачной мозаики (TMV) и терминатор транскрипции нопалинсинтазы (*nos-ter*) (рисунок 1).



Рисунок 1 – Схема рекомбинантных конструкций

Промотор транскрипции: варианты - 35S *CaMV* или *rd29A*; 5'-НТП – 5'-нетранслируемая последовательность (варианты 5'Y или 3xARC1); ген *AtDREB2A* – варианты *natAtDREB2A* или $\Delta AtDREB2A$; 8xHis-tag – гистидиновая метка; 3'-TMV – 3'-НТП вируса табачной мозаики; *nos-ter.* – терминатор транскрипции.

Трансформация растений картофеля. В качестве исходных сортов использовали сорта «Латона» и «8491-4». Трансформацию междоузлий и листовых дисков картофеля проводили методом кокультивирования с суспензией агробактерий. После инокуляции экспланты выкладывали на среду Мурасиге-Скуга (МС), содержащую 16 г/л глюкозы, 40 мг/л аденина, 1 мг/л биотина, 5 мг/л пантотената кальция.

Для регенерации каллусов добавляли фитогормоны в следующей концентрации: 0.05 мг/л НУК, 0.1 мг/л БАП. Через 2 суток в среду для регенерации добавляли цефотаксим до конечной концентрации 900 мг/л для подавления роста агробактерий. Через 2 недели экспланты переносили на среду для морфогенеза, содержащую те же элементы, что и среда для регенерации плюс 0,1 мг/л БАП; 2 мг/л зеатина; 900 мг/л цефотаксима, 50 мг/л канамицина; 10 мг/л $AgNO_3$. Переносили экспланты на свежую среду этого состава каждые 7-10 дней до появления побегов. Побеги срезали и помещали на среду для укоренения, содержащую соли МС, 1 мг/л глицина, 26 г/л сахарозы и 250 мг/л цефотаксима. **Выделение ДНК растений картофеля и детекция трансгена.** ДНК растений-регенерантов выделяли с помощью СТАВ. Наличие вставки определяли путем ПЦР-анализа с помощью праймеров, подобранных к 5'-концу гена *AtDREB2A* и 5'-концу 3'-TMV.

Результаты и их обсуждение

Из 89 проверенных растений 22 показали присутствие вставки (рис. 2, А). На рис. 2А видно, что с геномных ДНК всех представленных образцов амплифицируется ДНК-фрагмент длиной около 700 нуклеотидов, что свидетельствует о присутствии трансгена в геноме этих растений.

Для проверки экспрессии трансгена в растениях нами была выделена тотальная РНК из листовых дисков полученных линий. С использованием мРНК в качестве матриц в ходе реакции обратной транскрипции (РОТ) с участием $oligo(dT)_{18}$ были синтезированы кДНК, которые затем использовались в качестве матрицы в реакции ПЦР. Результаты электрофореза амплифицированных кДНК-фрагментов представлены на рисунке 2В. Несмотря на наличие вставки трансгена в геноме, некоторые варианты растений не показали экспрессии в нормальных условиях, что объясняется присутствием индуцибельного промотора в регуляторном участке трансгена.

Были также проведены испытания этих растений на устойчивость к засухе в условиях *in vitro*. Для моделирования засухи трансгенные растения были помещены в условия осмотического стресса (среда, содержащая 100, 200 и 300 мМ маннитола).

После месяца инкубации сравнили контрольные растения (без маннитола), содержащие трансген, с опытными образцами (рисунок 3). Таким образом, устойчивость к высокой концентрации осмотического агента проявили линии 62, 12, 81, 78, 35 и 68, трансгенные линии 64, 03, 60, 18, 77 и 79 оказались чувствительными к этому стрессу.

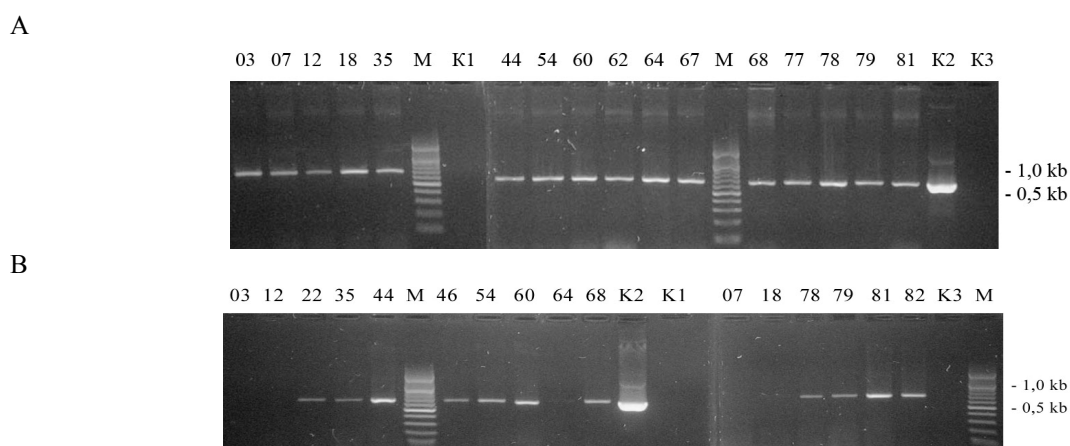


Рисунок 2 – Результаты исследования полученных трансгенных растений картофеля. Электрофорез в 1,2 % агарозном геле после анализа ДНК (А) и РНК (В) трансгенных растений с помощью ПЦР и реакции обратной транскрипции (03,...82 – номера трансгенных линий картофеля, М – маркер, 100 kb “Fermentas”, К1 и К3 – контроль отрицательный, К2 – контроль положительный)

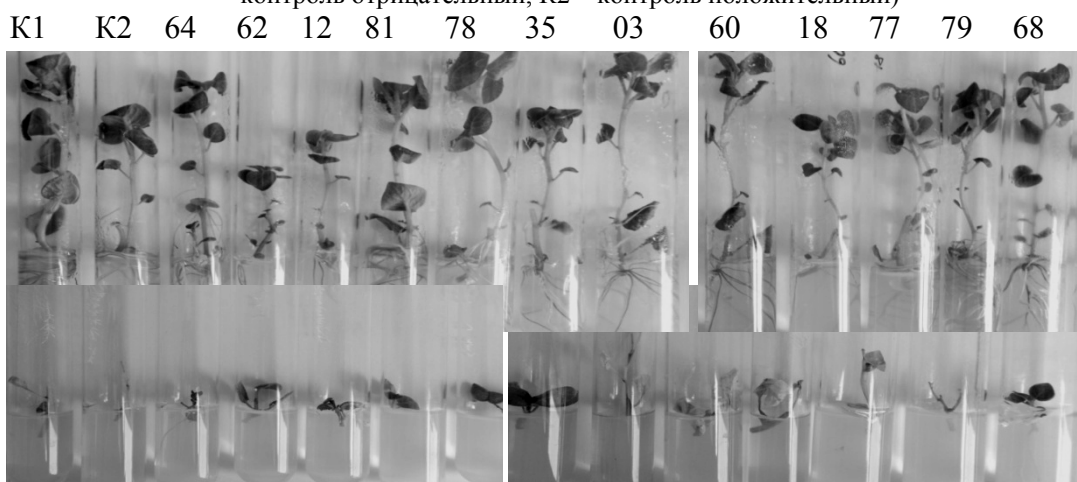


Рисунок 3 – Результаты испытаний пробирочных трансгенных растений картофеля в условиях моделируемой засухи после 1 месяца инкубации на питательной среде без маннитола (сверху) и с 300 мМ маннитола (нижний ряд). К1 и К2 – контрольные растения исходного сорта 8491-4, районированного в Казахстане

В дальнейшем нами планируется исследовать трансгенные линии картофеля на устойчивость к обезвоживанию в условиях *in vivo*, а так же измерить уровень экспрессии трансгенов методом ПЦР в реальном времени.

Литература

- 1 Bray E.A. et al. Responses to abiotic stresses. //Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. - 2000. - P.1158-249.
- 2 Rodríguez M. et al. Molecular aspects of abiotic stress in plants. //Biotecnología Aplicada. – 2005. – Vol. 22, № 1. – P. 1-10.
- 3 Seki M. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. //The Plant Journal. – 2002. - №31. – P. 279–292.
- 4 Bohnert H. J. et al. A genomics approach towards salt stress tolerance. //Plant Physiol. Biochem. – 2001. - №39. – P. 295-311.
- 5 Chen W. et al. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. //Plant Cell. – 2002. - №14. № – P. 559-74.
- 6 Fowler S et al. Arabidopsis transcriptome pro-filing indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. //Plant Cell. – 2002. - №14. – P. 1675-90.
- 7 Abdelaty S. et al. Plant AP2/ERF transcription factors. //Genetika. – 2003. - Vol. 35, №1. – P. 37-50.
- 8 Qiang Liu et al. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. //The Plant Cell. – Vol. 10, August 1998. – P. 1391–1406.