

УДК 577.216.3, 577.218

А.М. Писаренко\*, Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, Б.К. Исаков  
 Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан  
 \*e-mail: alena\_pisarenko@inbox.ru

### Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих транскрипционный фактор *AtDREB2A*

Целью работы является получение трансгенных растений табака, 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.

Получены трансгенные растения табака, несущие в своем геноме кодирующую последовательность транскрипционного фактора *AtDREB2A* в нативной и мутированной формах.

**Ключевые слова:** фактор транскрипции, *AtDREB2A*, засуха, засоление, табак.

### А. М. Писаренко, Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, Б.К. Ысқақов *AtDREB2A* транскрипциялық факторын экспрессиялайтын трансгендік темекі өсімдіктерін алу

Жұмыс мақсаты – өсімдіктердің құрғақшылыққа төзуінің молекулалық тетіктерін зерттеу үшін *AtDREB2A* транскрипциялық факторын табиғи және мутант түрде экспрессиялайтын трансгендік темекі өсімдіктерін алу.

*Arabidopsis thaliana*-ның *AtDREB2A* транскрипциялық факторын кодтайтын гениң ДНК бөлшегі көбейтілді, және кодтайтын тізбекке конститутивті әрекетті белок алу үшін делециялық мутагенез жасалды. Екі тізбек *CaMV* вирусының конститутивті 35S-промоторының және индуцибельді *rd29A* промотордың, сондай-ақ әртүрлі трансляция күшейткіштерінің бақылауында клондалды.

*AtDREB2A* транскрипциялық факторын табиғи және мутант түрде өз геномында сақтайтын трансгендік темекі өсімдіктері алынды.

**Түйін сөздер:** транскрипция факторы, *AtDREB2A*, құрғақшылық, тұздану, темекі.

### А.М. Pisarenko, R.M. Nargilova, O.V. Karpova, B.K. Iskakov Obtaining transgenic tobacco plants expressed transcription factor *AtDREB2A* gene

The task of this work is obtaining of transgenic tobacco plants, expressed transcription factor *AtDREB2A* gene in native and mutant forms for investigation of molecular mechanisms of plant resistance to drought.

DNA-fragment coding transcription factor *AtDREB2A* gene from *Arabidopsis thaliana* was amplified and deletion mutagenesis of coding sequence was carried out with the view of obtaining constitutively active protein. Both of sequences were cloned under control of 35S-promoter *CaMV* or inducible *rd29A* promoter and also different variants of translation enhancers.

The transgenic plants consisting coding sequences of transcription factor *AtDREB2A* in native and mutant forms in its genome were gained.

**Keywords:** transcription factor, *AtDREB2A*, drought, salinity, tobacco.

Транскрипционные факторы (ТФ) – это молекулярные регуляторы, контролирующие 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 и засоления (DREB от

drought resistance element binding). 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-SA [12-14].

### Материалы и методы

Создание трансгенных конструкций для трансформации растений было описано ранее [15].

Трансформацию листовых дисков табака *Nicotiana tabacum* (сорт Samsun NN) проводили методом кокультивирования с суспензией агробактерий. После инокуляции экспланты помещали на среду Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 2% сахарозы, с добавлением гормонов: бензиламинопурина – 1 мг/л; нафтилуксусная кислота – 0,1 мг/л.

Через двое суток экспланты перенесли на свежую среду MS2S, содержащую зеатин – 2 мг/л, индолилуксусную кислоту – 0,2 мг/л, а так же антибиотики: цефотаксим – 500 мг/л, канамицин – 150 мг/л. Затем пересадку эксплантов проводили каждые 10-14 суток до появления побегов на среду MS2S.

Полученные побеги срезали и помещали на среду MS3S без добавления гормонов,

содержащую антибиотики: цефотаксим – 500 мг/л, канамицин – 100 мг/л.

**Выделение ДНК растений картофеля и детекция трансгена.** ДНК растений-регенерантов выделяли с помощью СТАВ-метода. Наличие вставки определяли путем ПЦР-анализа с помощью праймеров, подобранных к 5'-концу гена *AtDREB2A* и 5'-концу 3'-TMV.

**Выделение РНК и реакция обратной транскрипции.** Препарат тотальной РНК выделяли из свежих листовых дисков полученных линий трансгенных растений табака с помощью тризола (Sigma).

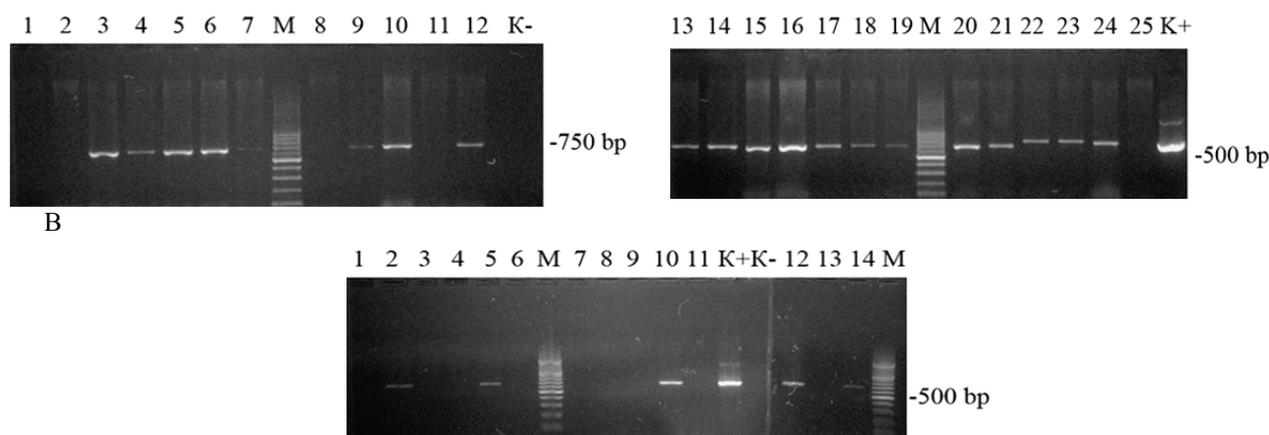
Реакцию обратной транскрипции (РТ-ПЦР) для наработки кДНК проводили согласно методике производителя ("Fermentas"), в качестве праймеров использовали oligo(dT)<sub>18</sub>. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для наработки фрагмента кодирующей последовательности *AtDREB2A*, которые затем наносили на электрофорез для визуализации результатов реакции.

### Результаты и их обсуждение

После проведения трансформации табака нами было получено 273 растения-регенеранта, из них 102 растения показали присутствие вставки рекомбинантного гена (рисунок 1, А). На рисунке 1А представлены результаты анализа препаратов тотальных ДНК: фрагмент размером 700 пар нуклеотидов (пн), обнаруженный в линиях растений 3-7, 9, 10, 15, 16, 20, 21, соответствует мутированному варианту гена  $\Delta AtDREB2A$ , содержащего делецию; фрагмент размером около 750 пн, обнаруженный в вариантах растений 12-14, 17-19, 22-24, амплифицируется в случае полнодлинного варианта гена *natAtDREB2A*.

Для проверки экспрессии трансгена нами была выделена тотальная РНК из листовых дисков полученных трансгенных растений. С использованием мРНК в качестве матриц в ходе реакции обратной транскрипции (РОТ) с участием oligo(dT)<sub>18</sub> были синтезированы кДНК, которые затем использовались в качестве матрицы в реакции ПЦР. Результаты электрофореза амплифицированных ДНК-фрагментов, полученных в ходе ПЦР-анализа кДНК, представлены на рисунке 1В.

А



Электрофорез в 1,2 % агарозном геле после анализа ДНК (А) и РНК (В) трансгенных растений с помощью ПЦР и реакции обратной транскрипции (1 – 25 линии трансгенных растений табака, М – маркер, 100 kb “Fermentas”, К– контроль отрицательный, К+ – контроль положительный)

**Рисунок 1** – Результаты исследования полученных трансгенных растений картофеля

Как видно на рисунке, в вариантах 2, 5, 10, 12 и 14 присутствует фрагмент ожидаемой длины, что свидетельствует об экспрессии трансгена в растениях табака.

Несмотря на наличие вставки трансгена в геноме, некоторые варианты растений (1, 3, 4, 6, 7-9, 11, 13) не показали экспрессии в нормальных условиях, что может быть связано

с присутствием индуцибельного промотора в регуляторном участке трансгена, который должен активировать транскрипцию только в условиях стресса [2, 8, 9].

В настоящее время нами начаты эксперименты по изучению устойчивости полученных линий табака к засухе и засолению в лабораторных условиях.

### Литература

- 1 Bray E.A. 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. 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. 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. 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. Plant AP2/ERF transcription factors // Genetika. – 2003. - Vol. 35. - №1. – P. 37-50.
- 8 Qiang L. 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. – 1998. – Vol. 10. – P. 1391–1406.
- 9 Hsieh T.H. Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/ dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato // Plant Physiol. – 2002. - №129. – P. 1086-94.
- 10 Agarwal P.K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants // Plant Cell. – 2006. - №25. – P. 1263–1274.

- 11 Shi-Qing Gao et al. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat // *Plant Cell Rep.* – 2009. - №28. - P. 301–311.
- 12 Sakuma Y. et al. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression // *Plant Cell.* – 2006. - №18. – P. 1292–1309.
- 13 Qin F. Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression // *Plant Cell.* – 2008. – Vol. 20. – P. 1693-1707.
- 14 Agarwal P. et al. Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity // *Mol. Genet. Genomics.* – 2007. – Vol. 277 – P. 189–198.
- 15 Писаренко, Наргилова и др. Получение растений картофеля, экспрессирующих транскрипционный фактор AtDREB2A // *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* – 2013. - №3/1 (59). – С. 164-168