

О. М. Бурлака, Я. В. Пірко,
член-кореспондент НАН України А. І. Ємець,
академік НАН України Я. Б. Блюм

Доставка генетичного матеріалу в рослинні клітини за допомогою вуглецевих нанотрубок

Проведено генетичну трансформацію протопластів, калюсу та листкових експлантів *Nicotiana tabacum* L. плазмідною ДНК pGreen0029 з використанням нековалентно функціоналізованих біологічними молекулами вуглецевих нанотрубок (ВНТ) як наноносіїв. Виявлено транз'єнтну експресію репортерного гена жовтого флуоресцентного білка YFP у протопластах. У результаті стабільної трансформації калюсу та листкових дисків геном *priII* отримано рослини-регенеранти *N. tabacum* на селективному поживному середовищі, що містило 50 мг/л канаміцину. Показано можливість застосування розроблених наноносіїв на основі одношарових ВНТ для трансформації протопластів та рослинних клітин, вкритих клітинною стінкою. Розроблені наноносії на основі багатшарових ВНТ виявилися менш ефективними для перенесення цільових генів, особливо у клітини калюсу та листкових експлантів, перш за все у зв'язку з обмежувальною роллю целюлозної стінки для їх проникнення у клітини та через їх більший діаметр, що призводить до пошкодження реципієнтних клітин.

Ключові слова: вуглецеві нанотрубки — ВНТ, одношарові вуглецеві нанотрубки — ОШВНТ, багатшарові вуглецеві нанотрубки — БШВНТ, наноносії ДНК, генетична трансформація рослин, тютюн *Nicotiana tabacum* L.

На сьогодні інтегрований розвиток нанотехнології та біотехнології створює інструментарій для ефективного вирішення ряду фундаментальних та прикладних задач біологічного спрямування на нанорівні. Зокрема, реалізація стратегії “від частини до цілого” дає можливість створювати точні, керовані енерго- та ресурсозаощаджувальні технології на заміну менш ефективним [1]. За цих умов наноматеріали являють собою основу для розробки ряду новітніх технологічних рішень для сучасної біотехнології. Виняткові властивості вуглецевих нанотрубок (ВНТ) для застосування в біотехнології визначаються поєднанням особливостей їх структури, фізичних та хімічних параметрів із нанорозміром [2]. Так, розробляються підходи з використання ВНТ для візуалізації, конструювання сенсорів, цільової доставки молекул у клітини тощо [3]. У цьому сенсі залучення ВНТ до розробки нових методик генетичної трансформації рослин асоційоване з рядом потенційних переваг, до кола яких можна включити підвищену ефективність, можливості застосування для широкого спектра таксономічних груп організмів, високий рівень відтворюваності, точність та відсутність необхідності прикладення надлишкової енергії чи використання потенційно токсичних сполук [4]. Є повідомлення про успішне застосування ВНТ для доставки плазмідної ДНК, малих інтерферуючих РНК, білків, ліків у клітини ссавців [5]. З використанням ВНТ проведено генетичну трансформацію клітин бактерій [6] і ссавців [7]. Також показано здатність ВНТ доставляти молекулярні вантажі у протопласти [8] та вкриті клітинною стінкою клітини рослин [9].

ВНТ мають псевдоодновимірну, “голкоподібну” структуру та побудовані зі згорнутих у безшовну трубку шарів графену, в яких атоми вуглецю формують гексагональну решітку. Така будова, з одного боку, є сприятливою для проникнення ВНТ усередину клітин, а з іншого — дозволяє ефективно приєднувати цільові вантажі до їх поверхні за рахунок ковалентних і нековалентних взаємодій. Залежно від кількості шарів ВНТ класифікують на одношарові вуглецеві нанотрубки (ОШВНТ) та багатшарові вуглецеві нанотрубки (БШВНТ). З урахуванням сфери застосування використовуються різні методи зміни морфології та властивостей поверхні ВНТ. Проте у випадку біотехнологічного використання коло методик модифікації обмежується такими критеріями, як гідрофільність, біологічна сумісність кінцевого продукту та можливість подальшого приєднання цільових макромолекулярних вантажів до поверхні модифікованих ВНТ. З огляду на це метою проведеного дослідження було вивчення здатності ОШВНТ та БШВНТ, нековалентно функціоналізованих молекулами біологічного походження, доставляти екзогенний генетичний матеріал у протопласти і клітини рослин, вкриті клітинною стінкою, та опосередковувати їх генетичну трансформацію.

У дослідженні використовували комерційні ОШВНТ і БШВНТ, синтезовані методом хімічного парофазного осадження (табл. 1). Для диспергування у водному середовищі та підвищення біологічної сумісності ВНТ функціоналізували за раніше розробленою методикою [10] з використанням дволанцюгової плазмідної ДНК (0,5 мг/мл), ізольованої за методом [11] із попередньо трансформованих компетентних клітин *Escherichia coli* штаму DH5 α , бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (10 мг/мл) (“Sigma”, США) та комерційного водного екстракту склистого тіла (ЕСТ) (“Біофарма”, Україна).

Для генетичної трансформації використовували бінарний вектор pGreen0029, що містить послідовність гена мембранного білка протеїнзберігальних вакуоль (α -tonoplast intrinsic protein), злитого з репортерним геном жовтого флуоресцентного білка YFP під контролем 35S промотору та pos-термінатору, а також селективний маркерний ген *nptII* неоміцинофосфотрансферази, який забезпечує стійкість до антибіотика канаміцину, під контролем 35S промотору та pos-термінатору. Приготування компетентних клітин та генетичну трансформацію *E. coli* штаму DH5 α конструкцією pGreen0029 проводили за методикою [12]. Плазмідну ДНК із клітин *E. coli* штаму DH5 α виділяли методом лужного лізису [11]. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично за допомогою приладу BioPhotometer plus (“Eppendorf”, Німеччина). Для приготування трансформаційних комплексів плазмідну ДНК у концентрації 1 мг/мл додавали в колоїдний водний розчин функціоналізованих ВНТ (1 мг/мл) в об’ємному співвідношенні 6 : 1, витримували протягом 5 хв при 75 °C на водяній бані ThermoStat plus (“Eppendorf”, Німеччина) та охолоджували суміш на льоду протягом 5 хв.

Таблиця 1. Характеристики використаних ВНТ

Показник	Одношарові ВНТ (ARS002, “Argy”, Німеччина)	Багатшарові ВНТ (698849, “Aldrich”, США)
Довжина, мкм	5–20	2,5–20 (10 — середня)
Діаметр, нм	1–2	6–13 — зовнішній 2–6 — внутрішній
Ступінь чистоти, мас. частка, %	90	99
Площа поверхні, м ² /г	400	220
Кількість шарів графену в стінці	1	7–13

Асептичні рослини *N. tabacum* вирощували на твердому поживному середовищі Мура-сіге–Скуга (МС) [13], що містило мікро- та макросолі, 30 г/л сахарози та 8 г/л агару (рН 5,8), при 24 °С за умов 16-годинного фотоперіоду. Протопласти з мезофілу асептичних рослин *N. tabacum* ізолювали за допомогою методу ферментативного розщеплення клітинної стінки [14] з використанням суміші ферментів, що містила 0,4% целюлази Onozuka R-10 (“Serva”, Німеччина), 0,3% дрицелази Driselase (“Sigma”, США), 0,5 М сахарози та 5 мМ CaCl₂, при 24 °С. Після фільтрування і відмивання розчином W5 (154 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 125 мМ CaCl₂; 5 мМ глюкози; рН 5,7) протопласти ресуспендували в поживному середовищі 8р [15]. Для трансформації додавали суміш функціоналізованих ВНТ з плазмідною ДНК pGreen0029 до суспензії протопластів у поживному середовищі 8р з розрахунку кінцевої концентрації ОШВНТ та БШВНТ у суспензії 20 та 15 мкг/мл відповідно. Після 24 год культивування на розсіяному світлі при 24 °С оцінювали транзйентну експресію за допомогою люмінесцентного мікроскопа Axioskop 40 (“Carl Zeiss”, Німеччина) із вбудованим фотоапаратом. Для детекції флуоресцентного сигналу YFP використовували збудження світлом з довжиною хвилі ~450–490 нм та фільтр для детекції емісії в діапазоні 500–550 нм. Комп’ютерну обробку мікрофотографій проводили з використанням програмного забезпечення AxioVision LE 4.8.2.0 (“Carl Zeiss MicroImaging GmbH”, Німеччина, 2010).

Для індукції калюсогенезу із травмованих листових дисків *N. tabacum* використовували поживне середовище МС, що містило 1 мг/л D-пантотенової кислоти (“Sigma”, США), 2 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) (“Duchefa Biochemie”, Нідерланди) та 2 мг/л нафтил-оцтової кислоти (НОК) (“Sigma”, США). Для трансформації калюсу і листових експлантів *N. tabacum* трансформаційну суміш комплексів плазмідної ДНК pGreen0029 із ВНТ розводили стерильною дистильованою водою до концентрації 40 мкг/мл у перерахунку на ОШВНТ і 30 мкг/мл у перерахунку на БШВНТ. Суміш наносили на поверхню ізолюваних експлантів калюсу та пошкоджену карборундом (“Sigma”, США) нижню поверхню листових експлантів. Протягом 2 діб експланти культивували на поживному середовищі МС для регенерації пагонів, що містило 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, після чого експланти переносили на середовище МС аналогічного складу, доповнене 50 мг/л канаміцину (“Sigma”, США). Рослинний матеріал при індукції калюсогенезу та селекції трансформантів культивували при 24 °С за умов 16-годинного світлоперіоду.

У результаті проведених досліджень виявлено здатність ВНТ транспортувати екзогенний генетичний матеріал у клітини рослин, а також зафіксовано відмінність ефективності застосування ОШВНТ і БШВНТ для трансформації рослинних клітин, вкритих клітинною стінкою [10]. Використаний підхід нековалентної функціоналізації ВНТ за допомогою молекул біологічного походження дав можливість отримати гідрофільні комплекси на основі ВНТ, здатні стабільно диспергуватись у водному середовищі та приєднувати цільові молекули ДНК. Завдяки цьому вдалося уникнути обмежень, асоційованих із використанням ряду традиційних методів хімічної та фізичної функціоналізації, що часто передбачають застосування токсичних реагентів та критичних умов проведення реакцій, є енергетично затратними і генерують продукти із підвищеною токсичністю для живих систем [3, 5]. Дослідження зразків функціоналізованих ВНТ за допомогою трансмісійної і атомно-силової мікроскопії, а також раманівської спектроскопії підтвердило утворення стабільних водних колоїдних систем ВНТ у результаті функціоналізації [10]. Крім того, було показано вкорочення ВНТ до довжини менше 1 мкм, що є сприятливим фактором для підвищення ефективності проникнення ВНТ усередину рослинних клітин [8].

Нековалентне приєднання молекул плазмідної ДНК pGreen0029 до поверхні ВНТ проводилось за умов використання індукованих температурною обробкою процесів розгортання–згортання молекул ДНК. За найбільш імовірним механізмом у результаті індукованого дією підвищеної температури розгортання молекули ДНК, ароматичні ділянки азотистих основ вступають у гідрофобну π – π -стекинг-взаємодію з вільними зонами поверхні ВНТ, тоді як гідрофільні залишки цукрів обертаються в бік водного середовища [3, 5, 10]. Внаслідок цього, молекули ДНК нековалентно іммобілізуються на поверхні ВНТ. Відомо також, що у складі подібних комплексів із ВНТ молекули ДНК уникають внутрішньоклітинного руйнування нуклеазами [8].

Здатність ВНТ переносити ДНК у клітини рослин оцінювали з використанням трьох типів модельних об'єктів: протопластів, калюсу та листкових дисків *N. tabacum*. У протопластах внаслідок ферментативного розщеплення клітинної стінки єдиним зовнішнім бар'єром є плазматична мембрана, що значно полегшує проникнення екзогенних агентів у їх середину, порівняно із рослинними клітинами, вкритими клітинною стінкою [1, 8]. При цьому варто зазначити, що для сучасних методів отримання трансгенних рослин, які ґрунтуються на трансформації протопластів, істотним недоліком є значний відсоток загибелі трансформованого матеріалу внаслідок дії дестабілізуючих мембрани хімічних сполук (як поліетиленгліколь), а також інтенсивних фізичних впливів (зокрема, при електропорації) [4]. У свою чергу, використання наноматеріалів, зокрема ВНТ, для доставки чужорідної ДНК у протопласти рослин розглядається як потенційно менш деструктивний підхід у зв'язку з можливістю підвищення біологічної сумісності ВНТ за рахунок функціоналізації та підбору ефективних доз. У проведеному дослідженні завдяки стандартизації процедури ізолювання показник середнього виходу становив $\approx 1,5 \cdot 10^6$ життєздатних протопластів на 1 г тканини листка. Генетичну трансформацію протопластів *N. tabacum* проводили за допомогою конструкції pGreen0029 з послідовністю гена *yfp*, що дало можливість детектувати його транзйентну експресію в протопластах через 24 год після трансформації за допомогою люмінесцентної мікроскопії (рис. 1). Було показано здатність ОШВНТ та БШВНТ, функціоналізованих БСА, ДНК та ЕСТ, доставляти ДНК у протопласти *N. tabacum*. Транзйентна експресія гена *yfp* у протопластах засвідчила збереження функціональної активності транспортних нанотрубок молекул ДНК, а також здатність їх від'єднуватися від наноносія всередині клітин та уникати деградації внутрішньоклітинними ферментами.

Оцінка можливості створення нанорозмірних систем доставки цільових молекул у рослинні клітини, вкриті клітинною стінкою, діаметр ОШВНТ < 5 нм, дає підстави припускати здатність їх проникати крізь пори клітинної стінки рослин [1, 2]. Водночас мікроскопічний діапазон значень довжини ВНТ є обмежуючим фактором ефективного проникнення їх у апопласт. Саме тому для розробки методів доставки цільових вантажів у клітини рослин, вкриті клітинною стінкою, обґрунтованим є використання вкорочених (завдовжки 100–500 нм) ВНТ [1]. БШВНТ, у свою чергу, розглядаються як менш застосовні для вкритих целюлозною стінкою клітин наноносії у зв'язку з їх більшим діаметром порівняно з ОШВНТ. З метою підвищення проникної здатності БШВНТ модифікують приєднанням ферментів целюлаз для локального руйнування целюлозної оболонки рослинної клітини у місці контакту з модифікованою нанотрубкою [9]. Така модифікація, однак, може ускладнювати приєднання цільових макромолекулярних вантажів до поверхні ВНТ. У проведеному дослідженні з використанням наноносіїв на основі функціоналізованих вкорочених ВНТ було здійснено генетичну трансформацію калюсу та листкових експлантів *N. tabacum* конструкцією pGreen0029 із селективним маркерним геном *nptII*. Було показано регенерацію

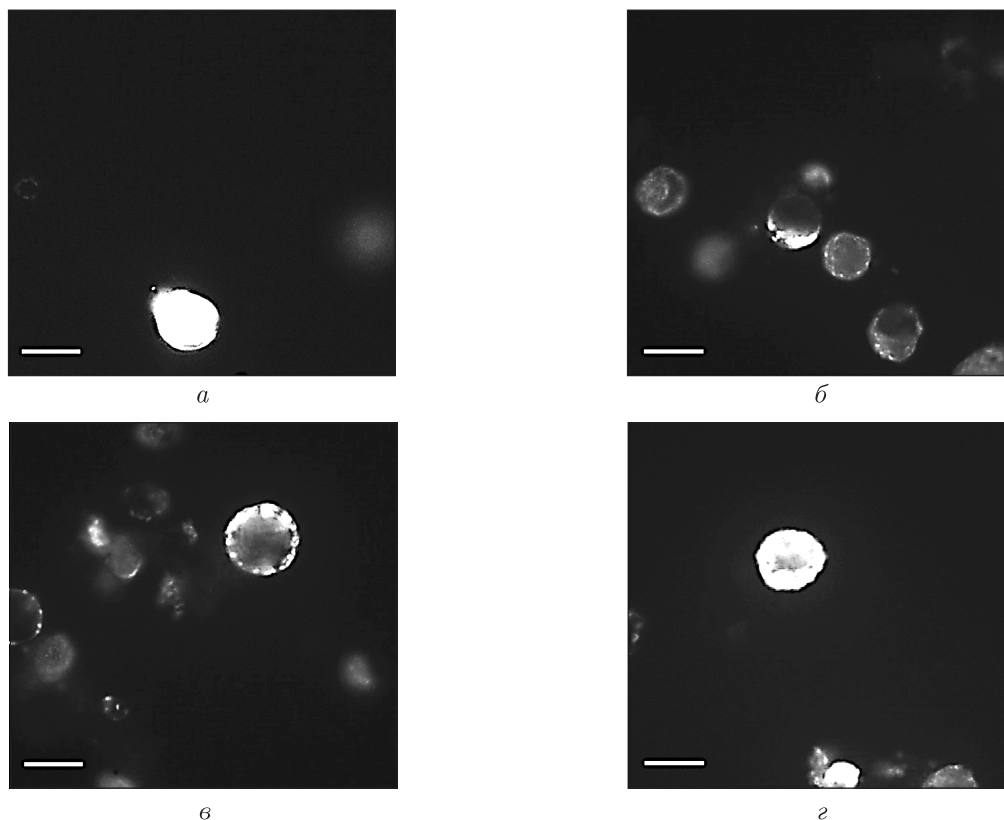


Рис. 1. Результати дослідження транзйентної експресії гена *yfp* у протопластах *N. tabacum* через 24 год після трансформації з використанням одношарових ВНТ (а, б), функціоналізованих за допомогою екстракту склистого тіла, та багатошарових ВНТ (в, з), функціоналізованих за допомогою бичачого сироваткового альбуміну. Масштабна позначка 20 мкм

пагонів із трансформованих за допомогою ОШВНТ (рис. 2) та БШВНТ тканин експлантів на поживному середовищі МС для регенерації пагонів, що містило 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК та 50 мг/л канаміцину. Значення частоти стабільної трансформації калюсу та листових експлантів *N. tabacum* у разі використання ОШВНТ як наноносіїв майже утричі перевищували показники, отримані за умов використання БШВНТ, тоді як значення частоти транзйентної трансформації протопластів за умов використання ОШВНТ і БШВНТ не дуже відрізнялися (рис. 3). Очевидно, що встановлена закономірність є результатом прояву бар'єрної ролі целюлозної стінки для проникнення БШВНТ у клітини.

Таким чином, результати дослідження свідчать про здатність нековалентно функціоналізованих молекулами біологічного походження ОШВНТ та БШВНТ доставляти екзогенні ДНК у протопласти та клітини рослин, вкриті клітинною стінкою. Проведено генетичну трансформацію протопластів, калюсу та листових експлантів *N. tabacum* і виявлено транзйентну експресію репортерного гена *yfp* у протопластах, а також регенерацію трансформованих генотипів стійкості до антибіотика канаміцину *nptII* рослин на селективному середовищі, що містило 50 мг/л канаміцину, із тканин калюсу і листових експлантів. Загалом, показано застосовність розроблених наноносіїв на основі ОШВНТ для трансформації протопластів та клітин рослин, вкритих клітинною стінкою. Водночас розроблені наноносії на основі БШВНТ показали застосовність для трансформації протопластів та меншу ефективність

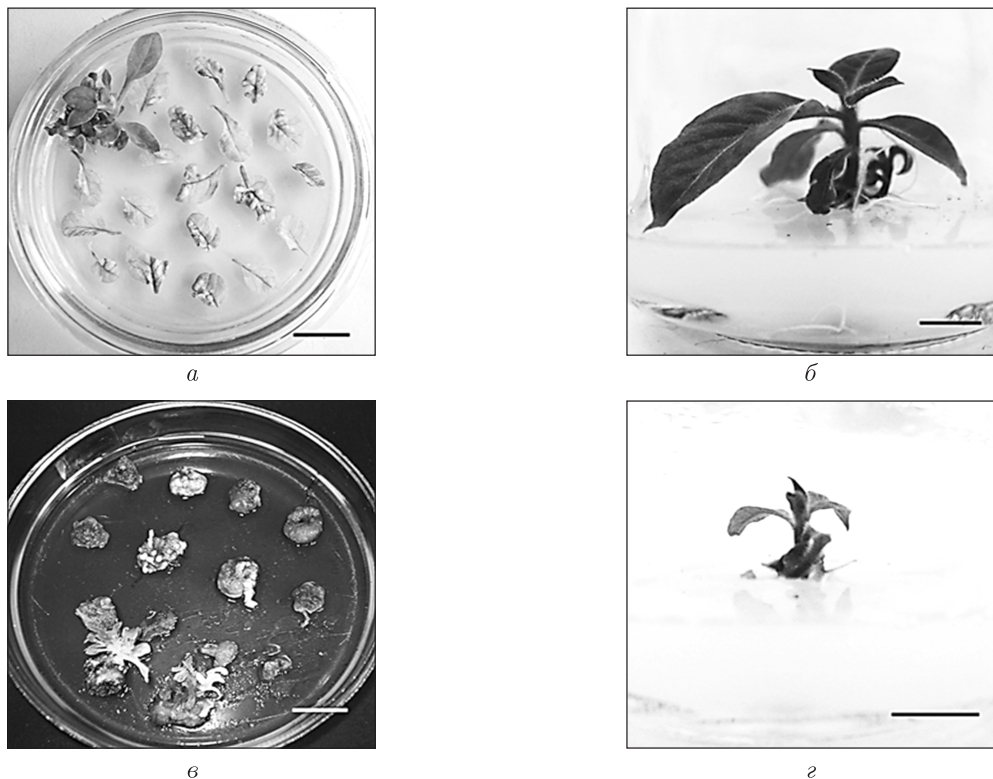


Рис. 2. Результати отримання рослин-регенерантів із листкових експлантів (а, б) та калюсу (в, г) *N. tabacum*, трансформованих з використанням одношарових ВНТ, функціоналізованих бичачим сироватковим альбуміном, на селективному середовищі, що містило 50 мг/л канаміцину. а — 6 тижнів; б — 2 місяці; в — 4 тижні; г — 6 тижнів

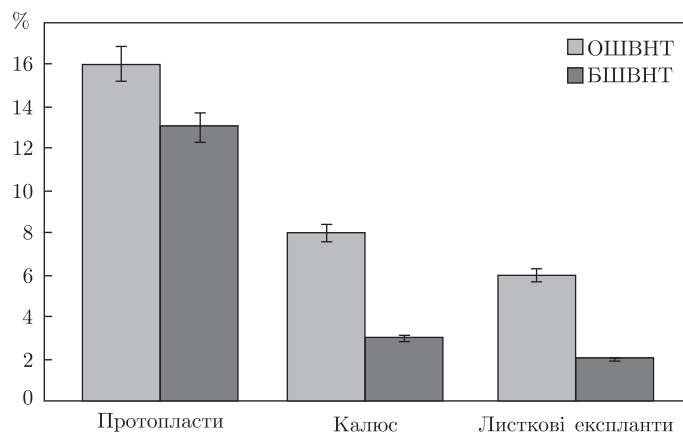


Рис. 3. Результати аналізу частоти транзійтної генетичної трансформації протопластів і стабільної генетичної трансформації калюсу та листкових експлантів *N. tabacum* з використанням одношарових та багатшарових ВНТ як переносників ДНК

для перенесення цільових генів, особливо в клітини калюсу та листкових експлантів, перш за все у зв'язку з обмежувальною роллю целюлозної стінки для їх проникнення в клітини та через їх більший діаметр, що призводить до пошкодження реципієнтних клітин.

Цитована література

1. Serag M. F., Kaji N., Habuchi S., Bianco A., Baba Y. Nanobiotechnology meets plant cell biology: carbon nanotubes as organelle targeting nanocarriers // RSC Adv. – 2013. – **3**. – P. 4856–4862.
2. Liu Q., Chen B., Wang Q., Shi X., Xiao Z., Lin J., Fang X. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells // Nano Lett. – 2009. – **9**, No 3. – P. 1007–1010.
3. Karousis N., Tagmatarchis N., Tasis D. Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes // Chem. Rev. – 2010. – **110**, No 9. – P. 5366–5397.
4. Rafsanjani M. S., Alvari A., Samim M., Hejazi M. A., Abdin M. Z. Application of novel nanotechnology strategies in plant biotransformation: a contemporary overview // Recent Pat. Biotechnol. – 2012. – **6**. – P. 69–79.
5. Бурлака О. М., Пірко Я. В., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Вуглецеві нанотрубки та застосування їх для генетичної трансформації рослин // Наноструктурное материаловедение. – 2011. – **2**. – С. 84–101.
6. Raffa V., Vittorio O., Costa M., Ziaei A., Nitodas S., Riggio C., Al-Jamal K., Gherardini L., Bardi G., Pizzorusso T., Karachalios T., Cuschieri A. Multiwalled carbon nanotube antennas induce effective plasmid DNA transfection of bacterial cells // J. Nanoneurosci. – 2012. – **2**, No 1. – P. 56–62.
7. Nunes A., Amsharov N., Guo C., Van den Bossche J., Santhosh P., Karachalios T. K., Nitodas S. F., Burghard M., Kostarelos K., Al-Jamal K. T. Hybrid polymer-grafted multiwalled carbon nanotubes for in vitro gene delivery // Small. – 2010. – **6**, No 20. – P. 2281–2291.
8. Serag M. F., Kaji N., Gaillard C., Okamoto Y., Terasaka K., Jabasini M., Tokeshi M., Mizukami H., Bianco A., Baba Y. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells // ACS Nano. – 2011. – **5**, No 1. – P. 493–499.
9. Serag M. F., Kaji N., Tokeshiac M., Baba Y. Introducing carbon nanotubes into living walled plant cells through cellulase-induced nanoholes // RSC Adv. – 2012. – **2**. – P. 398–400.
10. Бурлака О. М., Пірко Я. В., Смертенко П. С., Коломис О. Ф., Глазуніова В. О., Константинова Т. Є., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Функціоналізація вуглецевих нанотрубок за допомогою молекул біологічного походження різної природи // Доп. НАН України. – 2015. – № 2. – С. 137–144.
11. Lee S. Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. – 1990. – **9**, No 6. – P. 676–679.
12. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. – 1990. – **96**. – P. 23–28.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – **15**. – P. 473–497.
14. Potrykus I., Shillito R. D. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration // Methods Enzymol. – 1986. – **118**. – P. 549–578.
15. Kao K. N., Michayluk M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. – 1975. – **126**. – P. 105–110.

References

1. Serag M. F., Kaji N., Habuchi S., Bianco A., Baba Y. RSC Adv., 2013, **3**: 4856–4862.
2. Liu Q., Chen B., Wang Q., Shi X., Xiao Z., Lin J., Fang X. Nano Lett., 2009, **9**, No 3: 1007–1010.
3. Karousis N., Tagmatarchis N., Tasis D. Chem. Rev., 2010, **110**, No 9: 5366–5397.
4. Rafsanjani M. S., Alvari A., Samim M., Hejazi M. A., Abdin M. Z. Recent Pat. Biotechnol., 2012, **6**: 69–79.
5. Burlaka O. M., Pirko Ya. V., Yemets A. I., Blume Ya. B. Material Science of Nanostructures, 2011, **2**: 84–101.
6. Raffa V., Vittorio O., Costa M., Ziaei A., Nitodas S., Riggio C., Al-Jamal K., Gherardini L., Bardi G., Pizzorusso T., Karachalios T., Cuschieri A. J. Nanoneurosci., 2012, **2**, No 1: 56–62.
7. Nunes A., Amsharov N., Guo C., Van den Bossche J., Santhosh P., Karachalios T. K., Nitodas S. F., Burghard M., Kostarelos K., Al-Jamal K. T. Small, 2010, **6**, No 20: 2281–2291.
8. Serag M. F., Kaji N., Gaillard C., Okamoto Y., Terasaka K., Jabasini M., Tokeshi M., Mizukami H., Bianco A., Baba Y. ACS Nano, 2011, **5**, No 1: 493–499.
9. Serag M. F., Kaji N., Tokeshiac M., Baba Y. RSC Adv., 2012, **2**: 398–400.

10. Burlaka O. M., Pirko Ya. V., Smertenko P. S., Kolomys O. F., Glazunova V. O., Konstantinova T. E., Yemets A. I., Blume Ya. B. *Dopov. NAN Ukr.*, 2015, No 2: 137–144.
11. Lee S. Y., Rasheed S. *Biotechniques*, 1990, **9**, No 6: 676–679.
12. Inoue H., Nojima H., Okayama H. *Gene*, 1990, **96**: 23–28.
13. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.*, 1962, **15**: 473–497.
14. Potrykus I., Shillito R. D. *Methods Enzymol.*, 1986, **118**: 549–578.
15. Kao K. N., Michayluk M. R. *Planta*, 1975, **126**: 105–110.

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України”, Київ

Надійшло до редакції 03.04.2015

О. Н. Бурлака, Я. В. Пирко, член-корреспондент НАН України **А. И. Емец**,
академик НАН України **Я. Б. Блюм**

Доставка генетического материала в растительные клетки с помощью углеродных нанотрубок

ГУ “Інститут пищевої біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

*Проведена генетическая трансформация протопластов, каллуса и листовых эксплантов *Nicotiana tabacum* L. плазмидной ДНК pGreen0029 с использованием нековалентно функционализированных биологическими молекулами углеродных нанотрубок (УНТ) в качестве наноносителей. Выявлена транзистентная экспрессия репортерного гена желтого флуоресцентного белка YFP в протопластах. В результате стабильной трансформации каллуса и листовых дисков геном nptII получены растения-регенеранты *N. tabacum* на селективной питательной среде, содержащей 50 мг/л канамицина. Показана применимость разработанных наноносителей на основе однослойных УНТ для трансформации протопластов и растительных клеток, покрытых клеточной стенкой. Разработанные наноносители на основе многослойных УНТ оказались менее эффективными для переноса целевых генов, особенно в клетки каллуса и листовых эксплантов, прежде всего в связи с ограничивающей ролью целлюлозной стенки для их проникновения в клетки и из-за их большего диаметра, что приводит к повреждению реципиентных клеток.*

Ключевые слова: углеродные нанотрубки — УНТ, однослойные углеродные нанотрубки — ОСУНТ, многослойные углеродные нанотрубки — МСУНТ, наноносители ДНК, генетическая трансформация растений, табак *Nicotiana tabacum* L.

O. M. Burlaka, Ya. V. Pirko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Yemets**,
Academician of the NAS of Ukraine **Ya. B. Blume**

Gene material delivering into plant cells using carbon nanotubes

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kiev

*Genetic transformation of *Nicotiana tabacum* L. protoplasts, callus and leaf explants with plasmid DNA pGreen0029, using carbon nanotubes (CNTs) non-covalently functionalized with biological molecules as nanocarriers, is conducted. Transient expression of the reporter yellow fluorescent protein YFP gene in protoplasts is shown. Stable transformation of callus and leaf discs with nptII*

gene resulted in the regeneration of transformed *N. tabacum* plants on a selective culture medium containing 50 mg/l kanamycin. Single-walled CNTs-based nanocarriers demonstrated their applicability to the transformation of protoplasts, as well as walled plant cells. Whereas, the developed multiwalled CNTs-based nanocarriers were less efficient for the targeted gene transfer, especially into cells of callus and leaf explants, primarily due to the restrictive role of cellulose walls for their penetration into cells and because of their larger diameter, resulting in a damage to the recipient cells.

Keywords: carbon nanotubes — CNTs, single-walled carbon nanotubes — SWCNTs, multi-walled carbon nanotubes — MWCNTs, nanocarriers of DNA, genetic transformation of plants, tobacco *Nicotiana tabacum* L.