



УДК 577.218:577.29

А. С. Секан, С. В. Ісаєнков

Одноетапне отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей, за допомогою сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP під контролем мінімального 35S промотору

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

У ряді публікацій описано використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP під контролем тканиноспецифічних промоторів для отримання трансформантів, вільних від селективних маркерних генів (СМГ). Недоліком в даному випадку є створення специфічних умов для проведення трансформації або залучення додаткових агентів для ініціації експресії рекомбінази. Нами було розроблено новий підхід до використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від СМГ, та встановлено ефективність роботи рекомбінази Cre у наступному поколінні трансформованих рослин *A. thaliana*.

Стрімкий розвиток генетичної інженерії рослин протягом останніх десятиліть забезпечує підґрунтя для створення широкого спектра генетично модифікованих (ГМ) рослин, зокрема з покращеними сільськогосподарськими ознаками. Технології, що використовуються для створення таких рослин, дають змогу введення все більш широкого кола генів інтересу в рослинний геном. Але при цьому під час процесу трансформації разом з геном інтересу привносяться й самі різноманітні маркерні гени (селективні маркерні гени (СМГ)), яких на сьогодні налічується більше ніж 50 [1]. До них належать гени стійкості до антибіотиків та гербіцидів [2, 3]. Використання таких генів дозволяє проводити селекційний добір трансформованих клітин або тканин на етапі регенерації. Після завершення добору 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, що може спричинити виникнення нащадків з небажаними ознаками. Існують також застереження щодо можливості горизонтального перенесення генів. Тому розроблення генетично інженерних методів, за допомогою яких

© А. С. Секан, С. В. Ісаєнков, 2014

гарантовано можна уникнути такого розвитку подій, дозволило б розв'язати ряд проблем, пов'язаних з комерціалізацією ГМ рослин [4].

На сьогодні технологія сайт-специфічних рекомбіназних систем, яка є перспективною в цьому відношенні, набуває все більш широкого застосування [4–6]. Сайт-специфічна рекомбінація відбувається в районі специфічної послідовності або сайта розпізнавання. Це призводить до розщеплення або з'єднання цільових послідовностей в результаті інтеграції, делеції чи інверсії фрагментів ДНК без набуття або втрати нуклеотидів [5, 6]. Найвідомішими рекомбіназними системами, що використовуються для елімінації маркерних генів, є виділена з бактеріофагу P1 сайт-специфічна рекомбіназна система Cre-loxP [7]. Рекомбіназа Cre належить до родини тирозинових інтеграз, а сама система складається з двох коротких послідовностей ДНК: lox (locus of crossing-over) та гена cre [5].

У ряді публікацій описано застосування сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre-loxP під контролем тканиноспецифічних промоторів та промоторних послідовностей, виділених з генів теплового шоку. Так, для регуляції роботи системи Cre-loxP використовуються промотор, ідентифікований в зародкових тканинах [8], або індукційний промотор до гена теплового шоку HSP81–1 [9]. Недоліком використання таких послідовностей є необхідність створення специфічних умов для проведення трансформації або ж залучення додаткових агентів для ініціації експресії рекомбінази. Тому для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від СМГ, нами було розроблено новий підхід до використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre-loxP [10]. Цей підхід характеризується тим, що маркерні гени та цільова послідовність в трансформуючій конструкції знаходяться під контролем –46 мінімального 35S промотору (перші 46 п. н. від загальної послідовності промотору 35S) з вірусу мозаїки кольорової капусти (CaMV). Використання відповідної ДНК-конструкції в даному випадку передбачає швидку та ефективну трансформацію рослини, а під час трансформації рослинного матеріалу та періоду селекції відпадає необхідність застосування додаткових агентів або створення специфічних умов зовнішнього середовища. Разом з тим досить часто після події трансформації, спостерігається припинення експресії Т-ДНК в наступних поколіннях трансформантів. Тому нашою метою було дослідження ефективності роботи сайт-специфічної рекомбінази Cre-loxP у наступному (T₁) поколінні трансформованих рослин *Arabidopsis thaliana* для отримання зразків, вільних від маркерних послідовностей.

Аналіз стабільності трансформації здійснювали впродовж кількох поколінь трансформантів *Arabidopsis thaliana* (L.) еко типу *Columbia*. З цією метою трансформацію рослин здійснювали за допомогою методу квіткового занурення в агробактеріальну суспензію. Для трансформації рослин використовували два типи ДНК конструкцій: pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC. Різниця в будові конструкцій полягала в порядку розташування генів у трансформуючій касеті, тому на схемі наводиться будова лише однієї з цих двох ДНК-конструкцій. Позитивним контролем для відстеження події трансформації слугувала ДНК-конструкція, що позбавлена гена cre та сайтів ексцизії. Обидві ДНК-конструкції містили такі послідовності, як ген рекомбінази cre, репортерний ген gus, ген стійкості до гігроміцину nptII, що обмежувались сайтами ексцизії loxP, та термінуюча послідовність нопалін-синтази (nos) (рис. 1). Перераховані послідовності знаходились під контролем 35S промотору. Ген hptII в обох конструкціях був винесений за межі сайтів loxP і у випадку здійснення події ексцизії залишався в геномі рослини. Із загальної кількості трансформованих рослин було проаналізовано по 60 зразків (у подальшому ліній) з покоління T₀ для кожного типу ДНК конструкції.

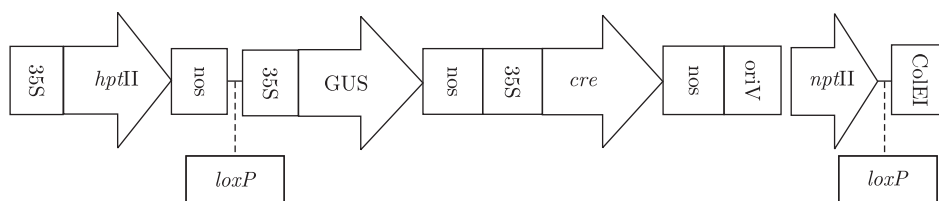


Рис. 1. Схема, яка ілюструє Т-ДНК конструкції рОРЕ-lox2HGC: 35S-промотор з віруса мозаїки кольорової капусти; *hptII* — ген стійкості до гігromіцину; *nos* — нопаліновий термінатор; *GUS* — ген глюкуронідази; *cre* — ген рекомбінази; *oriV* — сайт початку ініціації реплікації; *nptII* — ген неоміцинфосфотрансферази; *ColEI* — послідовність, що відповідає за реплікацію плазмід у клітинах бактерії *E. coli*

У подальшому насіння трансформованих рослин (покоління T_1) пророщували на селективному середовищі Мурасіге і Скуга [11] у присутності гігromіцину. Для виявлення подій ексцизії в геномі рослин за допомогою рекомбінази *Cre* в проростках на етапі селективного середовища проводили гістохімічний аналіз на наявність *GUS*-активності. Оскільки в обох типах конструкцій ген *gus* знаходився у ділянці, обмеженій сайтами ексцизії *loxP*, за допомогою *GUS*-тесту в проростках можна було встановити ефективність роботи рекомбінази. Гістохімічне визначення активності гену *gus* здійснювали методом, описаним у роботі [12]. Для того щоб уникнути ефект мовчання генів у введених Т-ДНК під час пророщування рослин на селективному середовищі, лінії з негативним або частково негативним результатом *GUS*-тесту були висаджені в ґрунт. Після культивування рослин у ґрунті впродовж 21–28 днів здійснювали повторний гістохімічний аналіз рослинних тканин на *GUS*-активність.

З метою підтвердження події видалення СМГ, обмежених сайтами ексцизії *loxP*, за допомогою рекомбінази *Cre* проводили молекулярно-генетичний аналіз геному рослин. Для проведення ПЛР виділяли ДНК зі свіжого листа за методом, описаним у статті [13]. Ампліфікацію цільових послідовностей (пара праймерів до послідовності в межах 35S промотору та гену *hptII*; пара праймерів до гену *cre*) за допомогою ПЛР здійснювали за такою схемою: початкова денатурація $-94\text{ }^\circ\text{C}$, 30 цикл. [$92\text{ }^\circ\text{C} - 30\text{ с}$, $60\text{ }^\circ\text{C} - 30\text{ с}$, $72\text{ }^\circ\text{C} - 90\text{ с}$], $72\text{ }^\circ\text{C} - 5\text{ хв}$. Продукти ампліфікації розділяли в 0,8%-му агарозному гелі. Для проведення Саузерн блот-гібридизації геномну ДНК виділяли, згідно з методом, описаним у статті [14]. Геномну ДНК (не менше 2 мкг на зразок) розрізали за допомогою рестриктази *KpnI*, яка розпізнає сайти на межі 5' та 3' кінців гену *hptII*. Фрагменти ДНК розділяли у 0,8%-му агарозному гелі та переносили на нітроцелюлозний фільтр. Для гібридизації використовували послідовність гена *hptII*, мічену $\alpha\text{-P}^{32}$ по цитозину.

Аналіз ефективності проростання насіння на селективному середовищі показав, що стабільність трансформації за допомогою обох типів векторних конструкцій (рОРЕ-lox1HGC й рОРЕ-lox2HGC) у поколінні T_1 є високою. Отримані дані свідчать про стабільну експресію кожної з векторних конструкцій в трансформантах. Отримані результати подальшого аналізу трансформантів з використанням *GUS*-тесту трансгенних ліній арабідопсису було поділено на три групи: перша — лінії з позитивним результатом *GUS*-тесту (рослини забарвлювались повністю); друга — лінії, в яких були присутні проростки з позитивним і негативним результатами *GUS*-тесту; третя — лінії з негативним результатом *GUS*-тесту. Відзначено, що в лініях першої групи досить велика кількість зразків була забарвлена лише частково (неоднорідне забарвлення тканин або окремих частин рослини), що вказує на виникнення химерності. Неоднорідне забарвлення рослинних тканин свідчить про видалення маркерних послідовностей з геном *gus* не з усього організму, а лише в окремих

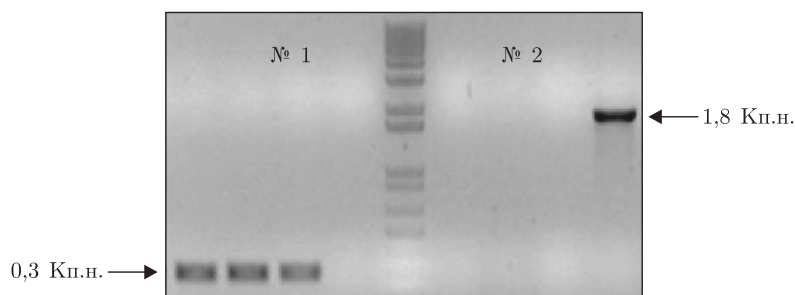


Рис. 2. Детекція видалення маркерної послідовності рекомбіназою Cre за допомогою ПЛР (у 0,8%-му агарозному гелі): 1 — перевірка присутності ДНК конструкції в рослинному геномі (праймери до 35S промотору та *nptII*), розмір продукту 0,3 Kbp; 2 — виявлення рослин із неактивною рекомбіназою Cre (праймери до послідовностей в межах сайтів ексцизії), розмір продукту 1,8 Kbp (подія автоексцизії не відбулась)

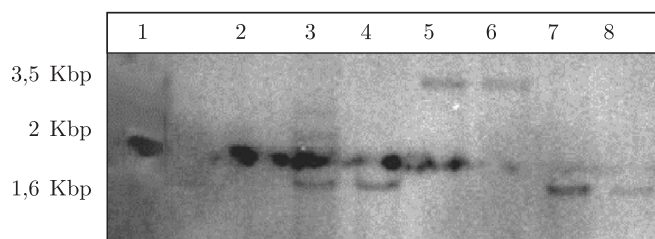


Рис. 3. Блот-гібридизація геномної ДНК різних ліній трансгенних рослин арабідопсису покоління T₁ до міченої послідовності гена *hptII*: 1 — позитивний контроль, плазміда pORE-lox2HGC; 2 — негативний контроль (ДНК з дикого типу *A. thaliana*); 3–5 та 7, 8 — видалення ділянки ДНК, обмеженої *loxP*-сайтами з геному трансформантів; 6, 7 — зразки геномів трансформантів з невидаленими ділянками СМГ

сукупностях клітин. За результатами GUS-тесту з'ясували, що приблизно 25% досліджуваних ліній, трансформованих ДНК конструкцією pORE-lox1HGC, є вільними від маркерних послідовностей, а в 12% ліній було виявлено як GUS-позитивні, так і GUS-негативні зразки. В лініях, трансформованих ДНК-конструкцією pORE-lox2HGC, відбулась автоексцизія в 15% загальної кількості протестованих ліній. Кількість ліній другої групи становила 13%. За результатами попереднього гістохімічного аналізу, проведеного на рослинах покоління T₀, відзначено приріст ліній третьої групи приблизно на 5–7% для кожного типу ДНК-конструкції, що свідчить про роботу рекомбінази і в наступних поколіннях трансформантів.

Для підтвердження роботи рекомбінази та події видалення ДНК у межах сайтів ексцизії після 3–4 тижнів культивування рослин у ґрунті було проведено їх ПЛР аналіз (рис. 2). У реакції використовувались праймери до 35S промотору та гена *hptII* поза межами сайтів ексцизії *loxP*, а також пара праймерів до гена *nptII*.

Саузерн-блот аналіз здійснювали для підтвердження результатів ПЛР та для виявлення мультикопійності Т-ДНК у геномі (рис. 3). Оскільки експресія привнесених генів у рослинах залежить від кількості копій Т-ДНК на геном, використання рекомбіназної ексцизії дає змогу мінімізувати ефект мультикопійності. Вперше така властивість сайт-специфічних рекомбіназ була описана в роботі [15]. Отже, за допомогою проведеної блот-гібридизації виявлено, що в зразках 7 й 8 кількість Т-ДНК зведена до мінімуму на геном.

Таким чином, в ході проведеної роботи, продемонстровано ефективне використання нового підходу для отримання трансгенних ліній рослин, вільних від маркерних послідовностей, та досягнення стабільності експресії Т-ДНК в наступному поколінні трансформантів.

За допомогою проведеного гістохімічного аналізу трансформантів покоління T₁ нами відзначена стабільна експресія Т-ДНК у рослинному геномі для обох типів конструкцій. Разом з тим у деяких трансформантів з позитивним результатом GUS-тесту експресія гена *gus* спостерігалась нерівномірно в різних тканинах рослин, що свідчить про їх химерність (неоднорідне забарвлення тканин). Відповідно можна вважати, що в наступних поколіннях ліній з химерними зразками сайт-специфічне видалення маркерних послідовностей відбудеться до кінця. Крім цього було з'ясовано, що в поколінні рослин T₁ кількість ліній арабідопсису, вільних від маркерних послідовностей, підвищувалась приблизно на 5–7%. Отже, методика отримання трансформантів з використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*loxP* є простою та не вимагає проходження додаткових етапів для активації роботи рекомбінази. Тому даний підхід можна ефективно застосовувати для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від маркерних послідовностей.

1. Rosellini D. Selectable markers and reporter genes: A well furnished toolbox for plant science and genetic engineering // *Crit. Rev. Pla.* – 2012. – **31**, No 5. – P. 401–453.
2. Yemets A. I., Baird W. V., Blume Ya. B. Modified tubulin genes as selectable markers for plant transformation // *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology* / Ed. Ya. B. Blume, W. V. Baird, A. I. Yemets, D. Breviario. – NATO Sci. Peace and Security, Series C: Environmental Security, 2009. – P. 435–454.
3. Manimaran P., Ramkumar G., Sakthivel K. et al. Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects // *Biotech. Adv.* – 2011. – **29**, No 6. – P. 703–714.
4. Рукавцова Е. Б., Лебедева А. А., Захарченко Н. С., Бурьянов Я. И. Пути создания биобезопасных трансгенных безмаркерных растений // *Физиология растений.* – 2013. – **60**, № 1. – С. 17–30.
5. Grindley N. D., Whiteson K. L., Rice P. A. Mechanisms of site specific recombination // *Annu. Rev. Biochem.* – 2006. – **75**. – P. 567–605.
6. Wang Y., Yau Y.-Y., Perkins-Balding D., Thompson J. G. Recombinase technology: applications and possibilities // *Plant. Cell. Rep.* – 2011. – **30**. – P. 267–285.
7. Sauer B., Henderson N. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic chromosome by the cre recombinase // *New Biol.* – 1990. – **2**. – P. 441–449.
8. Kopertekh L., Schulze K., Frolov A. et al. Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco // *Plant. Mol. Biol.* – 2010. – **72**. – P. 597–605.
9. Liu H. K., Yang C., Wei Z. W. Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants // *Plant. Sci.* – 2005. – **168**. – P. 997–1003.
10. Sekan A., Isaenkov S. New approach in site-specific recombinase Cre/*loxP* technology for producing of marker-free transgenic plants // In: 7th EPSO Conf. “Plants for a Greening Economy”, 1–4 Sept. 2013. – Porto Heli, Greece, 2013. – P. 163.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Phys. Plant.* – 1962. – **15**, No 3. – P. 473–497.
12. Jefferson R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1987. – **5**, No 3. – P. 87–405.
13. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acid. Res.* – 1980. – **8**, No 19. – P. 4321–4325.
14. Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. A plant DNA miniprep: version II // *Plant. Mol. Biol. Rep.* – 1983. – **1**, No 4. – P. 19–21.
15. Srivastava V., Anderson O. D., Ow D. W. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 11117–11121.

А. С. Секан, С. В. Исаенков

Одноэтапное получение трансформантов *Arabidopsis thaliana*, не содержащих маркерных последовательностей, с помощью сайт-специфической рекомбиназной системы Cre/loxP под контролем минимального 35S промотора

*В ряде публикаций описано использование сайт-специфической рекомбиназной системы Cre/loxP под контролем тканеспецифических промоторов для получения трансформантов, не содержащих селективных маркерных генов (СМГ). Недостатком в данном случае является необходимость создания специфических условий во время трансформации или вовлечения дополнительных агентов для инициации экспрессии рекомбиназы. Нами разработан новый подход к использованию сайт-специфической рекомбиназной системы Cre/loxP для получения генетически модифицированных растений, свободных от СМГ, и установлена эффективность работы рекомбиназы Cre в следующем поколении трансформированных растений *A. thaliana*.*

A. S. Sekan, S. V. Isaenkov

One-step transformation with site-specific recombinase Cre/loxP system under the control of minimal 35S promoter for the development of marker-free transgenic *Arabidopsis thaliana* plants

*In a number of works, the successful use of the site-specific recombinase system Cre/loxP under the control of chemical promoters to obtain marker-free transgenic plants was described. However, providing the transformation process with the conditional or another kind of treatment to initiate the recombinase expression is the disadvantage of this method. We have developed a new approach in the site-specific recombinase system Cre/loxP to produce marker-free genetically modified plants without any treatment and shown the efficiency of Cre recombinase in the progeny of transformed plants *A. thaliana*.*