

Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии  
и генетической инженерии НАН Украины, Киев  
E.mail: kuchuk@icb.kiev.ua

## ТРАНСГЕННЫЙ, ТРАНСПЛАСТОМНЫЙ И ТРАНЗИЕНТНЫЙ ПОДХОДЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ



*Обсуждены последние результаты экспериментов, проводимых в отделе генетической инженерии Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины по получению трансгенных и транспластомных растений, а также по использованию транзитной экспрессии для накопления рекомбинантных белков. Рассмотрены новые подходы по экспрессии беспромоторных генов в трансгенных растениях и получению транспластомных растений с использованием растительных «посредников».*

© Н.В. КУЧУК, 2007

В отделе генетической инженерии Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины проводятся многоплановые исследования, связанные с генетическими трансформациями у растений.

Важное место занимает разработка методов генетической трансформации и получение трансгенных растений у ряда сельскохозяйственных культур. Уже созданы трансгенные растения сахарной свеклы [1], рапса [2], томатов (В. Рудас), картофеля (Е. Кищенко), гороха [3] и фасоли (С. Нифантова) (таблица). Разработка методов генетической трансформации у каждого из этих видов имеет свои особенности и базируется в первую очередь на использовании генотипов сортов и линий отечественной селекции. Наряду с селективными генами для генетической трансформации ряда растений были использованы гены, которые определяют устойчивость к гербицидам. В отделе получены трансгенные растения рапса и сахарной свеклы, устойчивые к гербициду BASTA, а также горох и фасоль, устойчивые к гербициду Pivot.

Наряду со стандартными технологиями переноса генов в отделе изучаются альтернативные методы переноса и экспрессии чужеродных генов в растениях. Многие известны о механизмах работы транспозонов, широко использовавшихся для картирования и клонирования растительных генов. Поэтому встраивание гетерологичной системы транспозонов в геном растений, имеющих важное практическое значение, но не обладающих собственной похожей системой, представляет определенный интерес для клонирования их уникальных генов. Кроме этого, функционирующая система транспозонов позволяет быстро избавляться от нежелательных генетических маркеров, которые попадают в геном вместе с генетической конструкцией, а также облегчает перенос интересующего гена между геномом трансформированной линии и геномом селекционных линий в последующих половых скрещиваниях. Отсутствие эффекта сцепления генов при использовании транспозирующихся генов облегчает перенос интересующего признака в различные сорта одного вида при половых гибридизациях между трансгенной формой и селекционными линиями. В результате проведенных экспериментов у ряда селекционных линий сахарной свеклы были по-

лучены трансгенные растения, которые несли транспозирующуюся *Spm*-систему кукурузы (Е. Кищенко).

Интересной научной задачей, которая, кроме фундаментального, могла бы иметь и практическое применение, является вопрос о возможности межвидового перемещения транспозонов с одного генома на другой в отдаленных половых или соматических гибридах. Так, с помощью методов соматической гибридизации изучали возможность переноса генов с генома одного вида на геном другого в результате активности транспозонов *Spm*-семейства из кукурузы. Были получены соматические гибриды между горчицей или рапсом, с одной стороны, и арабидопсисом — с другой [4–6]. Горчица или рапс были «дикого» типа, т.е. не имели специфических генетических признаков в изучаемом нами диапазоне изменчивости. Арабидопсис был ранее трансформирован конструкцией, где ген устойчивости к гербициду BASTA был фланкирован последовательностями *dSpm* и способен к транспозиции в результате активности специфичной транспозазы, ген которой также находился в этой конструкции. Для детекции транспозиции использовали анализ активности гена GUS, которая проявлялась только в случае эксцизии транспозирующегося элемента вместе с геном

*bar*, разделявшим в исходной векторной конструкции структурную часть гена GUS и его промотор. Предполагалось, что у удаленных соматических гибридов, какими являлись межтрибные *Brassica + Arabidopsis*, будет происходить элиминация одного из геномов. Условия были подобраны таким образом, чтобы геном горчицы или рапса оставался, а геном арабидопсиса элиминировался. Регенерирующие колонии отбирали по устойчивости к гербициду BASTA.

В результате экспериментов были отобраны растения, устойчивые к BASTA, но внешне похожие на рапс или горчицу. Эти растения цвели, но потомства пока получить не удалось. Анализ изоферментов и анализ изменчивости ITS-повторов не выявлял присутствие генома арабидопсиса у этих растений. Однако при анализе присутствия трансгенов наряду с геном *bar*, который мог транспозироваться и перенестись на геном рапса или горчицы, всегда обнаруживались гены транспозазы и гена GUS, тесно связанные с геномом арабидопсиса. Таким образом, четкого доказательства переноса транспозирующихся генов между геномами у нестабильных гибридов получить не удалось в описанных комбинациях горчица + арабидопсис и рапс + арабидопсис, так как определенные участки генома арабидопсиса,

Трансгенные растения, полученные в отделе генетической инженерии ИКБГИ

Растительный вид	Селективный признак	Изучаемый или хозяйственно ценный признак
Сахарная свекла ( <i>Beta vulgaris</i> )	Устойчивость к канамицину	Активность системы транспозонов <i>Spm/dSpm</i>
То же	Устойчивость к фосфинотрицину	Устойчивость к гербициду BASTA
»	Устойчивость к фосфинотрицину и канамицину	Влияние lox-сайта на экспрессию не имеющего промотора <i>bar</i> -гена
»	Устойчивость к канамицину	Устойчивость к гербициду Pivot
Рапс ( <i>Brassica napus</i> )	Устойчивость к фосфинотрицину	Устойчивость к гербициду BASTA
То же	Устойчивость к фосфинотрицину и канамицину	Влияние lox-сайта на экспрессию не имеющего промотора <i>bar</i> -гена
Томаты ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Устойчивость к канамицину	Экспрессия репортерного гена
Картофель ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Устойчивость к фосфинотрицину и канамицину	Влияние lox-сайта на экспрессию не имеющего промотора <i>bar</i> -гена
Табак африканский ( <i>Nicotiana africana</i> )	Устойчивость к фосфинотрицину и канамицину	Влияние lox-сайта на экспрессию не имеющего промотора <i>bar</i> -гена,
Горох ( <i>Pisum sativum</i> )	Устойчивость к фосфинотрицину	Устойчивость к гербициду BASTA
Горох ( <i>Pisum sativum</i> )	Устойчивость к канамицину	Устойчивость к гербициду Pivot
Фасоль ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Устойчивость к канамицину	Устойчивость к гербициду Pivot

которые были связаны с трансгенами, по-видимому остались в наших гибридах. В то же время эти результаты позволяют несколько по-иному взглянуть на возможность сохранения или довольно длительного присутствия генов вида, чей геном элиминируется в отдаленных нестабильных гибридах. Похожие результаты нами получены и у половых гибридов *Nicotiana tabacum* × *Nicotina africana*.

Интересные результаты получены при исследовании экспрессии гена, не имеющего своего промотора в исходной генетической конструкции. В работе использовали генетические элементы из Cre-lox специфической системы рекомбинации. Беспромоторный баг-ген, кодирующий устойчивость к глюфолинату аммония или гербициду BASTA, был размещен в разных положениях на Т-ДНК Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* с присутствием или без присутствия дополнительного элемента lox-сайта перед кодирующей частью гена. Известно, что размещение беспромоторного гена вблизи правого бордера Т-ДНК приводит иногда к его экспрессии в трансгенных растениях в связи со встраиванием под промотор какого-либо собственного гена растения. Однако частота этого явления очень низка. В лучшем случае она достигает 20 % всех отобранных трансформантов. В наших экспериментах также было получено небольшое (около 1 %) количество устойчивых к гербициду растений, если беспромоторный баг-ген был расположен в таком положении. Однако если между структурной частью гена и правым бордером Т-ДНК располагался lox-сайт, то количество устойчивых растений резко возрастало и доходило до 80 % от числа первоначально отобранных по устойчивости к другому селективному маркеру — канамицину. Ген устойчивости к канамицину также находился в использованных генетических конструкциях, и первоначальный отбор трансформантов проводили именно по этому признаку. В то же время использование беспромоторного гена, даже вместе с lox-сайтом, но расположенного вдали от правого бордера, не вызывало никаких похожих явлений [2, 7, 8]. Подобные результаты были получены нами у целого ряда растений, принадлежащих к раз-

личным семействам, таким как сахарная свекла, табак, картофель, рапс. Эти результаты открывают возможность использования беспромоторных генов для получения генетически модифицированных растений и получаются только в случае доставки чужеродной ДНК с помощью агробактерий. «Прямая» генетическая трансформация табака этими же конструкциями путем бомбардировки не вызывала никаких подобных явлений, что дает основания говорить о возможном участии агробактериальных механизмов во встраивании и экспрессии беспромоторных генов.

Большое внимание мы уделяем методам получения транспластомных растений, т.е. растений, несущих чужеродную генетическую информацию не в ядерном геноме, а в пластоме. Получение транспластомных растений у хозяйственно ценных видов сулит ряд преимуществ по сравнению с ядерными трансформантами. Это и высокая экспрессия перенесенных генов, и возможность полицистронного регулирования, и экологическая безопасность, связанная с отсутствием чужеродных генов в пыльце. Однако все эти преимущества нивелируются большими проблемами, которые встречаются исследователями при попытках перенести гены в хлоропластный геном. Фактически только табак является объектом, где такая трансформация воспроизводится в разных лабораториях. Нами предложен новый метод хлоропластной трансформации с использованием растения-посредника, так называемого «clipboard» растения [9–11]. Суть метода заключается в том, что пластиды представляющего интерес растительного вида переносятся с помощью соматической гибридизации в растения вида, который можно легко культивировать и индуцировать регенерацию в условиях *in vitro*. После трансформации хлоропластной ДНК и получения транспластомного растения гибрида хлоропласты опять возвращаются в клетки исходного родителя. С помощью такой технологии получены трансформированные пласты у различных видов из семейства пасленовых [12–17]. Также нами получены транспластомные растения рапса, которые несут трансформированные хлоропласты *Lesquerella fendleri* [18]:



Трансформированный пластом	Растительный вид, содержащий трансформированный пластом
<i>Atropa belladonna</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Scopolia carniolica</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Physochlaina officinalis</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Lycium barbarum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Lycium barbarum</i>	<i>Lycium barbarum</i>
<i>Salpiglossis sinuata</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Salpiglossis sinuata</i>	<i>Salpiglossis sinuata</i>
<i>Solanum rickii</i>	<i>Solanum rickii</i>
<i>Solanum rickii</i>	<i>Lycopersicon peruvianum</i>
<i>Lesquerella fendleri</i>	<i>Brassica napus</i>

С точки зрения современной биотехнологии растения это уже не только объект аграрного производства, но и биологические системы, способные наряду с микроорганизмами и клетками животных производить фармацевтические белки и вакцины. Более того, растения как биологические системы гораздо более близки к животным и человеку, чем микроорганизмы, что позволяет синтезировать в них ценные белки, которые невозможно получить в бактериях. В то же время стоимость такого производства в десятки раз дешевле производства в клетках млекопитающих. Да и с точки зрения биологической безопасности растения отличаются в выгодную сторону от животных клеток и бактерий, так как у них не выявлено потенциально опасных для человека вирусов, прионов, эндотоксинов.

В отделе генетической инженерии была разработана достаточно простая система, где после инъекции специальной комбинации генов в листья некоторых видов австралийских табаков белок-синтезирующая система растения полностью переключается на синтез интересующего нас продукта [19]. Так, уже спустя неделю в листочке растения накапливается интересующий нас белок до уровня 5–80 % общего содержания белка растения. Такой подход может полностью революционизировать современное фармакологическое производство, где вместо ферментеров с бактериальной суспензией или очень дорогостоящих систем для выращивания клеток млекопитающих будут использоваться оранжереи.

Проведенные нами исследования позволили не только изучить новые способы переноса и экспрессии генетической информации в

растениях. Они открывают практические возможности для создания в Украине новых растений, которые могут успешно использоваться как в сельском хозяйстве для повышения продуктивности и защиты от биотических и абиотических стрессов, так и для производства фармацевтических белков и вакцин.

**SUMMARY.** The review represents the latest results of the experiments carried out at the Department of genetic engineering of the Institute of cell biology and genetic engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine in the field of creation of transgenic and transplasmic plants as well as the use of transient expression for production of recombinant proteins. The new approaches of promoterless gene expression in transgenic plants and construction of transplasmic plants using «clipboard» species are discussed.

**РЕЗЮМЕ.** Обговорюються останні результати експериментів, що проводяться у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, з метою одержання трансгенних та транспластомних рослин, а також використання транзиентної експресії для отримання рекомбінантних білків. Розглядаються нові підходи щодо експресії безпромоторних генів у трансгенних рослинах і для одержання транспластомних рослин з використанням рослин-«посередників».

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кіщенко О.М., Комарницький І.К., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Отримання трансгенних рослин цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) ліній O-типу за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 5. — С. 3–8.
2. Сахно Л.А., Гецько І.О., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Растения *Brassica napus* и *Orychophragmus violaceus* (*Brassicaceae*), трансформированные Cre-lox-содержащими конструкциями // Фактори експериментальної еволюції організмів : 36. наук. пр. / За ред. М.В. Роїка. — Київ : Аграр. наука, 2003. — С. 366–371.
3. Нифантова С.Н., Симоненко Ю.В., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Получение трансгенных растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.), устойчивых к гербициду Pursuit // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 6. — С. 16–21.
4. Сахно Л.А., Сытник Е.С., Череп Н.Н., Комарницький І.К., Кучук Н.В., Климяк В.И. Активность системы Spm транспозонов кукурузы у трансгенных растений *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Shultz, полученных путем как прямого переноса ДНК в протопласты, так и агробактериальной трансфор-

- мацией корневых эксплантов // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 6. — С. 3—8.
5. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.М., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Отримання і аналіз соматичних гібридів *Brassica napus* + *Arabidopsis thaliana*, що містять гетерологічну систему транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm* // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 3. — С. 50—56.
  6. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.М., Рудас В.А., Кучук М.В. Отримання міжтрибних соматичних гібридів дигеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Arabidopsis thaliana*) та тетрагеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana*) походження та їх використання для вивчення поведінки гетерологічної системи транспозонів *Spm/dSpm* // Біополімери та клітина. — 2005. — 21, № 1. — С. 35—41.
  7. Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Генетическая трансформация растений *Nicotiana africana* Мегхт. плазмидами, содержащими сайты рекомбинации *lox* // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 4. — С. 3—8.
  8. Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Гецко И.О., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Изучение влияния *lox*-сайтов *Cre-lox* системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях // Цитология и генетика. — 2006. — 40, № 1. — С. 3—9.
  9. Василенко М.Ю., Комарницький І.К., Сахно Л.А., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Получение и анализ межродовых соматических гибридов между *Brassica napus* и линией типа «albino» *Orychophragmus violaceus* // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 1. — С. 3—10.
  10. Kuchuk N., Sytnik K., Vasilenko M., Shakhovskiy A., Komarnitsky I., Kushnir S., Gleba Yu. Genetic transformation of plastids of different *Solanaceae* species using tobacco cells as organelle hosts // Theor. Appl. Genet. — 2006. — 113, № 3. — P. 519—527.
  11. Vasilenko M., Ovcharenko O., Kuchuk N., Gleba Yu. Production of cybrids in *Brassicaceae* species // Molecular Biology. Vol. 318: Plant Cell Culture Protocols. — Totowa, NJ : Humana Press Inc. — 2006. — P. 221—234.
  12. Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Генетическая трансформация хлоропластной ДНК *S. rickii* // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 5. — С. 3—8.
  13. Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Момот В.П., Кучук Н.В. Регенерация гибридных растений *Lycopersicon peruvianum* × (*Solanum rickii*) с трансформированными хлоропластами // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 6. — С. 3—8.
  14. Ситник К.С., Кучук М.В. Отримання транспластомних рослин *Salpiglossis sinuate* // Наук. вісн. НАН України. — 2003. — 65. — С. 52—55.
  15. Ситник К.С., Комарницький І.К., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Генетична трансформация пластомив гибридных растений *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*) та *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaene officinalis*) // Укр. бот. журн. — 2003. — 60, № 5. — С. 517—522.
  16. Ситник Е.С., Парий А.Ф., Комарницький І.К., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Анализ ядерного и митохондриального геномов у транспластомных растений *Salpiglossis sinuata*, полученных путем переноса трансформированных пластид от гибрида *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 5. — С. 3—8.
  17. Sytnik E., Komarnitsky I., Gleba Y., Kuchuk N. Transfer of transformed chloroplasts from *Nicotiana tabacum* to the *Lycium barbarum* plants // Cell Biol. Int. — 2005. — 29. — P. 71—75.
  18. Нітовська І.О., Шаховський А.М., Череп М.Н., Горденська М.М., Кучук М.В. Отримання гибридных транспластомних рослин *Brassica napus* з хлоропластами *Lesquerella fendleri* // Цитология и генетика. — 2006. — 40, № 4. — С. 3—11.
  19. Sheludko Y.V., Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M., Bannikova M.A., Kuchuk N.V. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression // Biotech. Bioeng. — 2006. — 96. — P. 608—614.

Поступила 15.12.06