

И.В. ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА¹, Н. МИРАХОРЛИ¹,
А.Р. МААЛИ^{1,2}, Е. ИСАЕНКО³, Н.А. КАРТЕЛЬ³,
Н.О. ЮРЬЕВА⁴, И.А. АБДЕЕВА¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук,

Москва 119991 ул. Губкина, 3; E-mail: irengold@vigg.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Россия, Москва, Воробьевы горы

³ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Минск, 220072, ул. Академическая, 27

⁴ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ



Сконструированы экспериментальные модели первичных трансформантов картофеля, экспрессирующие гибридный ген *cry3aM-lisVM2*. Молекулярно-биологический анализ и биотесты экспериментальных моделей позволяют предложить новую систему экспрессии *cry*-генов в растениях, основанную на экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и на использовании в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора, обеспечивающего преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) — органах-мишенях для насекомых-вредителей. Показано, что присутствие лихеназы в составе гибридных белков облегчает проведение отбора и анализа уровня экспрессии гибридных белков в трансгенных организмах. Основываясь на свойствах репортерного белка лихеназы, входящего в состав гибридных белков, представляется возможным использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах, поскольку эта система является достаточно простой и точной и не требует больших материальных и временных затрат.

© И.В. ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА, Н. МИРАХОРЛИ,
А.Р. МААЛИ, Е. ИСАЕНКО, Н.А. КАРТЕЛЬ,
Н.О. ЮРЬЕВА, И.А. АБДЕЕВА, 2007

Введение. Открытие в начале XX века инсектицидного действия токсинов *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) имело важные последствия в вопросе защиты растений от насекомых-вредителей. В последующие десятилетия для защиты растений от насекомых применялись и по настоящее время применяются биологические препараты, основой которых являются эти микроорганизмы и/или их метаболиты. Действующие агенты биопрепаратов являются компонентами природных биоценозов, что объясняет их относительную безопасность для окружающей среды, человека, животных, птиц, рыб и полезной энтомофауны. Следующим знаменательным событием, предопределившим ход событий в защите от насекомых, было создание растений, которые сами продуцировали указанные токсины (*Cry*-белки). В настоящее время получены трансгенные растения кукурузы, картофеля, хлопка, риса, экспрессирующие *cry*-гены [1–4]. Экспрессия нативных *cry*-генов *Bacillus* в растениях даже при переносе делеционных вариантов нативных генов, которые кодируют только токсическую часть белка, малоэффективна [1, 5]. Причина низкого уровня экспрессии этих генов в эукариотических системах обусловлена рядом факторов: относительно высоким содержанием А+Т в ДНК *Bacillus* и различием в частоте использования кодонов в генах *Bacillus*, которые значительно отличаются от аналогичных показателей для эукариот (растений). При замене нуклеотидов в последовательностях *Bacillus* синонимичными кодоном растений экспрессия модифицированных генов в растениях значительно увеличивается [3, 6].

Проблемы биобезопасности трансгенных растений, в том числе экспрессирующих *cry*-гены, являются актуальными. *Cry*-белки изучаются достаточно долго. Показано, что они не являются токсичными для млекопитающих, птиц, амфибий, рептилий, и специфично влияют на определенные группы насекомых и беспозвоночных вредителей [7]. В то же время наиболее острым остается вопрос неконтролируемого переноса генетической информации от трансгенов в окружающую среду, в дикорастущие растения, в том числе сорные. Несмотря на многочисленные исследования, этот вопрос пока не до конца разработан. В связи с этим разработка новых подходов, позволяющих производить такие исследования

быстро, точно и с минимальными затратами, является актуальной.

В настоящее время для идентификации трансгенов используется целый арсенал молекулярно-биологических методов: Нозерн- или Вестерн-блот гибридизация, визуализация РНК или белка *in situ*, определение ферментативной активности белкового продукта (если таковая имеется), и ряд других [8]. Однако эти методы в большинстве случаев требуют больших затрат времени, реагентов, а также специального оборудования, и исследователи для изучения экспрессии интересующих их последовательностей часто используют стратегию репортерных систем, благодаря которым можно определять как уровень экспрессии исследуемых генов (транскрипционные репортеры), так и локализацию их продуктов (трансляционные репортеры). Такие исследования проводятся с использованием гибридных последовательностей, которые состоят из последовательности интересующего исследователя гена, слитого в рамке считывания с последовательностью репортерного гена. Это значительно облегчает проведение исследований, поскольку зачастую проще определить продукт репортерного гена, нежели продукт исследуемого гена [9]. Следует подчеркнуть, что *cry3a*-ген кодирует белок, не обладающий ферментативной активностью, за счет которой можно определить как уровень его экспрессии (количественно), так и молекулярную массу белкового продукта. Ранее мы показали, что для изучения экспрессии целевых генов в клетках про- и эукариот в качестве трансляционного репортера может быть использована термостабильная лихеназа [10–13]. Так, было показано, что гибридный ген *cry3aM-licBM2* эффективно экспрессируется в клетках низших эукариот дрожжей, и белок *Cry3aM* в составе гибридного белка *Cry3a-LicBM2* сохраняет свою биологическую активность — инсектицидное действие на личинки колорадского жука [14].

Исследование посвящено созданию экспериментальных моделей с целью разработки новых подходов к созданию трансгенных растений, устойчивых к насекомым за счет экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и использованию в качестве регуляторного эле-

мента светоиндуцибельного промотора, который обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) — органах-мишенях для насекомых-вредителей.

Материалы и методы. В работе использованы стандартные процедуры молекулярного клонирования, которые проводились согласно методическому руководству [15]. Использовали растения картофеля *Solanum tuberosum* сорта Десница и Юбилей Жукова. Агробактериальную трансформацию растений картофеля осуществляли по разработанному нами методу из микроклубней. Отбор трансформантов и дальнейшее их поддержание проводили на среде МС с добавлением 50–100 мкг/мл канамицинсульфата. Молекулярно-биологический анализ первичных трансформантов растений проводили с использованием методов ПЦР, а также количественных и качественных методов определения активности лихеназы. Белковые лизаты для определения активности лихеназы получали разрушением клеток в 50 мМ трис-НСl, рН 8,0 ультразвуком с последующим центрифугированием при 12 000 g в течение 30 мин для осветления препаратов. Количественное определение лихеназной активности в растительных белковых лизатах проводили по модифицированной нами методике [16]. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин. Зимограммы получали разделением белков в 10 % или в 8–16 % ДСН-ПААГ, содержащем субстрат лихенан, с последующим окрашиванием гелей 0,5%-ным раствором Конго красного (Sigma) и отмыванием в 1 М NaCl.

Инсектицидную активность рекомбинантных белков в дрожжевых экстрактах и кристаллах *Bt var tenebrionis* тестировали на личинках первого возраста колорадского жука (*Leptinotarsa disemlineata*). Анализ растений картофеля на устойчивость по отношению к личинкам первого возраста колорадского жука проводили *in vitro*.

Данные в таблицах и на рисунках представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, полученные при обработке результатов пяти независимых экспериментов, если не указано особо.

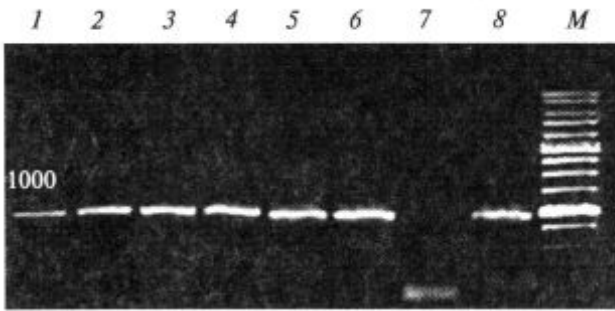


Рис. 1. Анализ геномной ДНК контрольного растения (дорожка 7) и первичных трансформантов растений линии *Сгу3аМ-licBM2* (дорожки 1–6) методом ПЦР; М — маркер молекулярных масс. Цифрой обозначен размер фрагментов

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты эффективной экспрессии гибридного гена *cry3aM-licBM2* в клетках низших эукариот дрожжей, а также результаты по сохранению биологической активности белка *Сгу3аМ* в составе гибридного белка *Сгу3аМ-licBM2* позволили предположить, что этот ген будет эффективно экспрессироваться и в растениях картофеля с сохранением биологической активности белковых продуктов [14]. С целью проверки этого предположения был сконструирован экспрессионный вектор для трансформации растений, обозначенных *pC29-leader-cry3aM-licBM2*:

RBCS Leader *cry3aM licBM2* pA,

где RBCS — промотор гена малой субъединицы РБФК/О, Leader — последовательность лидерного пептида гена РБФК (*rbcS*) гороха, *cry3aM* — модифицированный ген дельта-эндотоксина, *licBM2* — репортерный ген термостабильной лихеназы, pA — область полиаденилирования.

В этом векторе гибридный ген *cry3aM-licBM2*, слитый в рамке считывания с последовательностью лидерного пептида гена малой субъединицы РБФК/О (*rbcS*) гороха, находится под контролем светоиндуцибельного промотора гена малой субъединицы РБФК/О (*rbcS*) *Arabidopsis thaliana*.

Выбор в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора (*rbcS*) обусловлен тем, что этот промотор обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемого им гена в зеленых тканях растения — листьях,

являющихся органами-мишенями для личинок колорадского жука. Использование лидерного пептида (leader) обосновано тем, что он способен транспортировать белок в хлоропласт (компаратмент растительной клетки с невысоким уровнем протеолитической активности), что в свою очередь обеспечит поддержание достаточного количества гетерологичного белкового продукта для защиты растений от личинок колорадского жука.

В качестве растительного материала были использованы сорта картофеля Юбилей Жукова и Десница. В результате трансформации растений картофеля было отобрано 17 независимых первичных трансформантов линии *Сгу3аМ-licBM2*. Отбор первичных трансформантов проводили на селективной среде МС, содержащей канамицин. Первичные трансформанты растений, укоренившиеся на среде с канамицином, были использованы для дальнейших экспериментов.

Первоначально регенеранты линии *Сгу3аМ-licBM2*, устойчивые к канамицину, проанализированы методом качественного определения активности лихеназы. Проведенные эксперименты позволили отобрать трансформанты растений картофеля линии *Сгу3аМ-licBM2*, которые экспрессируют перенесенный гибридный ген. Далее первичные трансформанты растений картофеля были проанализированы методом ПЦР. При анализе первичных трансформантов линии *Сгу3аМ-licBM2* использовали специфические праймеры к последовательностям лидерного пептида и второго фрагмента гена *cry3aM* (последовательность лидерного пептида — 200 п.н., последовательность первого и второго фрагментов гена *cry3aM* — 800 п.н.). После проведения ПЦР с этими праймерами образуется фрагмент размером около 1000 п.н., что соответствует размеру этих последовательностей (рис. 1). Следует отметить, что у всех первичных трансформантов линии *Сгу3аМ-licBM2*, отобранных на селективной среде с канамицином, а затем по активности лихеназы, выявлены ПЦР-фрагменты соответствующего размера, тогда как у первичных трансформантов, у которых после отбора на селективной среде активность лихеназы не обнаружена, ожидаемые ПЦР-фрагменты не выявлены (данные не приводятся).

Полученные результаты ПЦР-анализа свидетельствуют о том, что термостабильная лихеназа может использоваться в качестве удобного репортера для отбора трансгенных организмов, и эффективность трансформации (доля трансформантов на один регенерант), рассчитанная по экспрессии репортерного белка лихеназы, является более объективной величиной, чем рассчитанная по экспрессии селективного агента — канамицина.

Для доказательства того, что в растениях картофеля эффективно синтезируются рекомбинантные белки, первоначально белковые экстракты первичных трансформантов линии *Cry3aM-LicBM2* были проанализированы методом зимограмм (рис. 2). Анализ белковых экстрактов выявил полосы активности лихеназы у всех первичных трансформантов этой линии с молекулярной массой около 95 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной молекулярной массе белкового продукта, который должен образовываться в результате экспрессии гибридных генов в растениях (рис. 2).

Известно, что уровень продукции гетерологичных белков в трансгенных растениях варьирует в широких пределах и составляет от 0,001 до 15 % суммарного растворимого белка. Для того чтобы определить уровень накопления белковых продуктов в первичных трансформантах растений картофеля линии *Cry3aM-LicBM2*, мы провели количественное определение активности лихеназы, которая входит в состав гибридных белков *Cry3aM-LicBM2*, в белковых экстрактах из контрольных растений и первичных трансформантов (таблица). Для сравнения уровня накопления рекомбинантных белков в растениях были использованы бактериальные белковые экстракты с известной концентрацией термостабильной лихеназы. У большинства первичных трансформантов растений линии *Cry3aM-LicBM2* уровень накопления рекомбинантных белков составил от 0,05 до 0,1 % общего количества растворимых белков. Полученные нами результаты показывают, что светоиндуцибельный промотор гена *gbcS* обеспечивает высокий уровень экспрессии перенесенных генов в растениях. Для того чтобы показать, что светоиндуцибельный промотор обеспечивает уровень экспрессии гибридного гена *Cry3aM-LicBM2*, достаточный

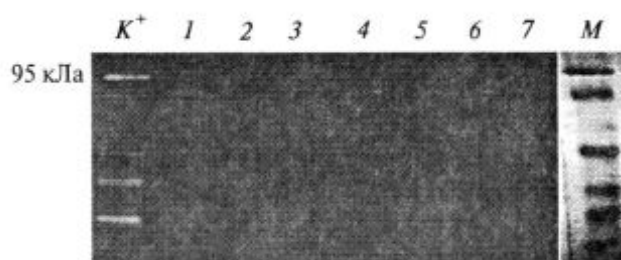


Рис. 2. Зимограмма белковых экстрактов, полученных из контрольных растений (дорожка 2) и первичных трансформантов растений (дорожки 1, 3–7), экспрессирующих гибридные белки *Cry3aM-LicBM2*: K^+ — белковые экстракты из *E. coli*, экспрессирующих ген *Cry3aM-LicBM2*; *M* — маркеры молекулярных масс

Уровни накопления рекомбинантных белков в первичных трансформантах картофеля и результаты биотестов

Линия первичных трансформантов	Активность лихеназы, ед./мг суммарного белка	Уровень накопления рекомбинантных белков, % суммарного белка	Биотест, % смертности
ЮБ-S-L(1)	0,44 ± 0,05	0,03	37
ЮБ-S-L(2)	1,16 ± 0,20	0,08	—
ЮБ-S-L(3)	0,90 ± 0,19	0,06	55
ЮБ-S-L(4)	0,87 ± 0,10	0,06	61
Д-S-L(1)	0,6 ± 0,10	0,04	38
ЮБ-S-L(6)	1,10 ± 0,14	0,07	—
ЮБ-S-L(7)	1,20 ± 0,20	0,09	—
Д-S-L(2)	0,34 ± 0,07	0,02	—
Д-S-L(3)	1,25 ± 0,25	0,1	81

Примечание. ЮБ и Д — обозначение сортов картофеля Юбилей Жукова и Десница соответственно; S-L — *Cry3aM-LicBM2*. Прочерки — биотест не проводился.

для защиты растений картофеля против личинок колорадского жука, были проведены биотесты с использованием некоторых независимых трансформантов, у которых выявлена активность репортерного белка лихеназы.

Анализ первичных трансформантов картофеля линии *Cry3aM-LicBM2* на устойчивость по отношению к личинкам первого возраста колорадского жука проводили с использованием молодых листьев в чашках Петри в стандартных условиях. В качестве контролей использовали листья контрольных растений картофеля, с двух сторон обработанные раствором чистого кристаллического белка *Cry3a* в

концентрации 1 мкг/мм² (положительный контроль), либо буфером для растворения кристаллического белка Сгу3а (отрицательный контроль).

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице. Первичные трансформанты показали от 35 до 81 % эффективности (токсичности), тогда как контрольные растения, обработанные раствором кристаллического белка, проявляли 100 % токсичности. Следует подчеркнуть, что выявлена положительная корреляция между процентом смертности личинок и уровнем накопления гибридных белков в первичных трансформантах (таблица). Таким образом, было показано, что гибридный белок Сгу3аМ-licBM2, который нарабатывается в первичных трансформантах картофеля, эффективно экспрессируется и обеспечивает достаточно высокий уровень защиты растений против личинок колорадского жука.

Представленные результаты исследования продемонстрировали, что в составе гибридного белка Сгу3аМ-licBM2 белок Сгу3аМ сохраняет свою биологическую активность — инсектицидное действие на личинки колорадского жука, а лихеназа сохраняет основные свойства трансляционного репортерного белка — термостабильность и активность, что свидетельствует о возможности использования лихеназы в качестве трансляционного репортера при изучении экспрессии генов, кодирующих продукты с высокой молекулярной массой. Метод зиммограм — метод качественного определения активности лихеназы — может использоваться как альтернативный методу Вестерн-блот гибридизации при использовании лихеназы в качестве трансляционного репортера.

Показано, что присутствие лихеназы в составе гибридных белков облегчает проведение отбора и анализа экспрессии рекомбинантных белков в трансгенных организмах, что является важным при проведении поисковых исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека», РФФИ (06-04-81009-Бел_а, 05-04-49186-а, 04-04-81039-Бел_а) и гранта «Ведущие научные школы» НШ-4202.2006.4.

SUMMARY. Experimental models of the potato primary transgenic plants which express the hybrid gene *cry3aM-licBM2* have been created. Molecular analysis and the biotests of the experimental models allow proposing a new system of *cry* genes expression in plants. The system is based on the expression of hybrid genes possessing the sequence of reporter lichenase gene and the use as a regulator element of a light-induced promoter providing preferential expression of the controlled genes only in green plant tissues (leaves) — the target tissues for pests. The lichenase presence in hybrid proteins facilitates selection and analysis of the expression level of the hybrid proteins in transgenic organisms. Basing on the lichenase properties in hybrid proteins it seems possible to use this reporter system for transgene monitoring in agroecosystems as this system is rather simple and precise and does not need large material and time expenses.

РЕЗЮМЕ. Сконструйовано експериментальні моделі первинних трансформантів картоплі, що експресують гібридний ген *cry3aM-licBM2*. Молекулярно-біологічний аналіз та біотести експериментальних моделей дозволяють запропонувати нову систему експресії *cry*-генів у рослинах, засновану на експресії гібридних генів, до складу яких входить послідовність репортерного гена лихенази, та на використанні світлоіндуцибельного промотора як регуляторного елемента, що забезпечує переважну експресію генів, що контролюються, тільки в зелених тканинах рослин (листя) — органах-мішенях для комах-шкідників. Показано, що присутність лихенази у складі гібридних білків полегшує проведення відбору та аналізу рівня експресії гібридних білків у трансгенних організмах. Спираючись на властивості репортерного білка лихенази, що входить до складу гібридних білків, можна використати цю репортерну систему для моніторингу трансгенів в агроценозах, оскільки ця система є достатньо простою і точною та не потребує значних матеріальних і часових затрат.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Евстратова В.В., Калиев А.Б., Андрианов В.М., Пирозян Э.С. Использование векторных плазмид *Agrobacterium* для переноса в растения генов дельта-эндотоксина из *Bacillus thuringiensis* // Вестн. с.-х. науки. — 1988. — № 384. — С. 71—77.
2. Гулина И.В., Шульга О.А., Миронов М.В. и др. Экспрессия частично модифицированного гена δ-эндотоксина из *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* в трансгенных растениях картофеля // Молекуляр. биология. — 1994. — 28, № 5. — С. 1166—1175.
3. Cao J., Zhao J.Z., Tang J.D. et al. Broccoli plants with pyramided *cry1Ac* and *cry1Cb* genes control diamond-back moths resistant to *Cry1A* and *Cry1C* proteins // Theor. Appl. Genet. — 2002. — 105. — P. 258—264.

4. Conner A.J., Travis R.G., Nap J.-P. The release of genetically modified crops into the environment // *Plant J.* — 2003. — **33**. — P. 19—46.
5. Perlak F.J., Stone T.B., Muskopf Y.M. et al. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles // *Plant Mol. Biol.* 1993. — **22**. — P. 313—321.
6. Adang M.J., Brody M.S., Cardineau G. et al. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cry3A* gene in protoplasts and potato plants // *Plant Mol. Biol.* — 1993. — **21**. — P. 1131—1145.
7. Schnepf E., Crickmore N., Vanrie J. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1998. — **62**. — P. 775—806.
8. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. — М.: Наука, 2000. — 527 с.
9. Голденкова И.В. Репортерные системы: возможности для изучения различных аспектов регуляции экспрессии генов // *Усп. соврем. биологии.* — 2002. — **122**, № 6. — С. 515—526.
10. Piruzian E.S., Goldenkova I.V., Mysiychuk K.A. et al. Reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* // *Mol. Genet. Genom.* — 2002. — **266**. — P. 778—786.
11. Комахин Р.А., Абдеева И.А., Салехи Джузани Г.Р., Голденкова И.В., Жученко А.А. Термостабильная лихеназа как трансляционный репортер // *Генетика.* — 2005. — **41**, № 1. — С. 31—40.
12. Сотченков Д.В., Голденкова И.В., Мирахоли Н., Волкова Л.В. Модификация последовательности гена дефензина SD2 из подсолнечника и его экспрессия в бактериальных и дрожжевых клетках // *Генетика.* — 2005. — **41**, № 11. — С. 1453—1461.
13. Пирузян Э.С., Богуш В.Г., Сидорук К. В., Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Дебабов В.Г. Конструирование синтетических генов, кодирующих белки — аналоги белка каркасной нити паутины спидроина 1, и их экспрессия в растениях табака // *Молекуляр. биология.* — 2003. — **37**, № 4. — С. 654—662.
14. Салехи Джузани Г.Р., Комахин Р.А., Пирузян Э.С. Сравнительный анализ экспрессии нативного и модифицированного генов *cry3a* *Bacillus thuringiensis* в прокариотических и эукариотических клетках // *Генетика.* — 2005. — **41**, №2. — С. 171—177.
15. Маниатис Т., Фрич Э.Д. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1980. — 480 с.
16. Мусийчук К.А., Голденкова И.В., Абдеев Р.М. и др. Получение и свойства делеционных вариантов лихеназы *Clostridium thermocellum* и создание на их основе бифункциональных гибридных белков // *Биохимия.* — 2000. — **65**, № 12. — С. 1659—1665.

Поступила 14.07.06.