

Л. И. Рачек, С. В. Стороженко, Н. В. Кучук

ПОЛУЧЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.), СОДЕРЖАЩИХ Ds-ЭЛЕМЕНТ КУКУРУЗЫ

Обладающие повышенной регенерационной способностью растения гороха (*P. sativum* L.) трансформированы конструкцией, содержащей Ds-элемент системы контролирующих элементов Ac/Ds кукурузы. Трансформацию проводили кокультивированием растительных тканей с *Agrobacterium tumefaciens*. Селектирован ряд устойчивых к канамицинсульфату линий. При помощи методов ПЦР-анализа и Саузерн-блоттинга-гибридизации показана интеграция Ds-элемента в состав геномной ДНК гороха.

Введение. Подход к клонированию генов с применением транспозирующих элементов (gene tagging) используется для выделения новых генов, у которых либо сильно затруднено, либо вообще невозможно определение биохимических свойств их продуктов [1—3]. Клонирование генов методом gene tagging осуществимо как с помощью эндогенных транспозирующихся элементов (гомологичная система транспозонов), так и элементов, выделенных из другого вида (гетерологичная система транспозонов). К настоящему времени с использованием гомологичной системы транспозонов были клонированы уникальные гены кукурузы и львиного зева [4, 5].

Несмотря на то, что недавно обнаружены транспозирующиеся элементы у табака и арабидопсиса [6, 7], эти системы транспозонов еще недостаточно изучены для того, чтобы применять их в качестве гомологичной системы в экспериментах по gene tagging. Наиболее хорошо исследованным среди растительных транспозонов является семейство контролирующих элементов Ac/Ds кукурузы. Поэтому Ac/Ds-элементы кукурузы чаще всего используют в качестве системы гетерологичных транспозонов при клонировании генов растений с помощью метода gene tagging. Например, было показано, что Ac-элемент кукурузы сохраняет свою активность при введении его в клетки табака, томата, арабидопсиса, моркови и риса [8—12]. Есть также сведения об Ac-индуцируемой мобильности Ds-элемента в клетках риса (*Oryza sativa*), петунии (*Petunia hybrida*) и *Nicotiana plumbaginifolia* [13—15]. Недавно были опубликованы первые сообщения о клонировании генов при помощи гетерологичной системы транспозонов. С использованием системы Ac/Ds кукурузы были клонированы ген, кодирующий окраску лепестков венчика у петунии [16], и DRL1-локус *Arabidopsis thaliana* [17]. Гетерологичную систему транспозонов другого класса — En/In — применяли при клонировании гена мужской стерильности 2 *A. thaliana* [18].

Хотя круг растений, в клетках которых работает гетерологичная система транспозонов Ac/Ds кукурузы, постоянно расширяется, данные о подобных экспериментах для видов из семейства бобовых, в частности для гороха, на сегодняшний день отсутствуют. Наряду с этим еще со времен Менделя горох является излюбленным объектом генетических исследований и сейчас продолжает привлекать внимание ученых. В связи с этим мы предполагаем его использовать как объект при изучении транспозонового мутагенеза с помощью гетерологичной

© Л. И. РАЧЕК, С. В. СТОРОЖЕНКО, Н. В. КУЧУК, 1995

системы транспозонов. Кроме того, горох как представитель семейства бобовых являет собой уникальную модель для исследования и клонирования генов, участвующих в симбиотической системе азотфиксации.

Цель настоящей работы состояла в получении трансгенных растений гороха, содержащих *Ds*-элемент кукурузы.

Материалы и методы. Для трансформации растений использовали плазмиду *pSK3*, любезно предоставленную д-ром Дж. Хилле (Независимый Университет, Амстердам). Плазмидную ДНК выделяли по модифицированной методике Бирнбойма и Доли [19]. Основной для ее наработки служил штамм *Escherichia coli* JM101. Трансформацию растений осуществляли с помощью штамма *A. tumefaciens* LBA4404 [20].

Конструкцию *pSK3* переносили в агробактерии с помощью метода прямой трансформации [21]. Для подтверждения факта трансформации из предполагаемых трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проводили ее рестрикционный анализ.

В опытах использовали постоянно культивируемые *in vitro* регенерационные линии гороха посевного (*P. sativum* L.), ранее полученные в нашей лаборатории [22]. Растения выращивали в асептических условиях на среде Гамборга В5 [23]. Кусочки листьев и стеблей помещали в колбу (100 мл) с 30 мл жидкой питательной среды ВБ5 и добавляли 1 мл свежей ночной культуры агробактерии. Среда ВБ5 представляет собой модификацию среды В5N [24], в которой отсутствует глутатион и уменьшены концентрации аденина и мезоинозитола. Материал инкубировали на шейкере в течение 2 сут при 150 об/мин на рассеянном свете. Аналогично манипулировали с контрольным вариантом (без *A. tumefaciens*). Через 48 ч отмытые и слегка подсушенные на фильтровальной бумаге ткани переносили на агаризованную питательную среду ВБ5 с клафораном и карбенциллином в концентрации 400 мкг/мл. Через 2—3 недели (после образования первичного каллуса) ткани целиком переносили на лишенную фитогормонов среду В5, содержащую 100 мг/л канамицинасульфата.

Для проведения ПЦР применяли ранее разработанные праймеры для амплификации последовательности 35S-промотора [25]. В реакции использовали 10—100 нг суммарной растительной ДНК, выделенной с помощью ЦТАБ [26]. Реакцию амплификации осуществляли, как изложено в [25]. После 30 циклов амплификации образцы фракционировали в 2%-м агарозном геле.

Растительную ткань исследовали на содержание неоминифосфотрансферазы при помощи набора NPTII ELISA Kit («5-Prime-3-Prime Inc.», США). Суммарный белок экстрагировали из растительной ткани и определяли в нем содержание неоминифосфотрансферазы по методу Нагела и др. [27] с учетом рекомендаций фирмы-изготовителя. Концентрацию белка определяли с помощью набора BCA Protein Assay Reagent Kit («5-Prime-3-Prime Inc.», США).

Суммарную ДНК выделяли с использованием ЦТАБ [26]. Для гибридизации применяли нейлоновые фильтры Сартолон («Sartorius», ФРГ). Гель, полученный после электрофореза рестрицированной ДНК, обрабатывали 0,25 М HCl в течение 15 мин и 0,5 М NaOH в течение 30 мин (перенос осуществляли в 25 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,2, в течение ночи). Саузерн-гибридизацию вели в 0,5 М Na-фосфатном буфере, pH 7,2, 7%-м DS-Na, 1 мМ ЭДТА в течение ночи. Фильтры отмывали 4 раза по 1 ч в буфере, содержащем 40 мМ Na-фосфат, pH 7,2, 1%-й DS-Na, 1 мМ ЭДТА при 65 °C [28]. В качестве зонда использовали фрагменты ДНК, меченные ³²P по методу расщепления затравки [29] до удельной активности 10⁹ имп·мкг⁻¹·мин⁻¹ с помощью набора Random Primed DNA Labelling Kit («Boehringer Mannheim», ФРГ).

Результаты и обсуждение. Для трансформации растений гороха применяли конструкцию *pSK3*, содержащую маркерный ген неоминифосфотрансферазы и *Ds*-элемент кукурузы, в составе которого нахо-

дится ген глюкуронидазы (*GUS*-ген) *E. coli*. Схема Т-ДНК плазмиды представлена на рис. 1.

Первым шагом на пути к получению трансгенных растений явилось введение плазмиды *pSK3* в штамм агробактерий LBA4404. Конструкцию вводили в штамм агробактерии с помощью прямой трансформации. Для подтверждения факта трансформации из предполагаемых трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проводили ее рестрикционный анализ (данные не представлены).

С полученным штаммом агробактерии кокультивировали кусочки листьев и стеблей гороха, согласно методике, описанной выше. Образовавшийся на среде EB5 первичный каллус переносили на безгормональную среду B5, содержащую 100 мг/л канамицинсульфата. Через

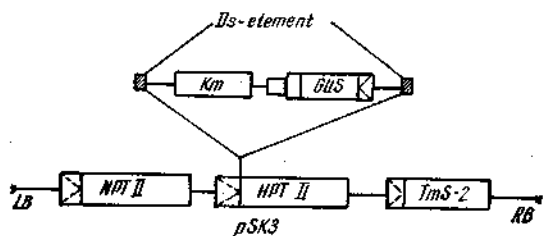


Рис. 1. Схема Т-ДНК плазмиды *pSK3*. LB и RB — граничные последовательности Т-ДНК

Рис. 2. Регенерирующие побеги гороха, полученные после трансформации плазмидой *pSK3*



2—3 месяца на каллусах (преимущественно стеблевого происхождения) начали появляться интенсивно-зеленые очаги регенерации, из которых впоследствии образовывались побеги. На селективной среде, содержащей 100 мг/л канамицинсульфата, были отобраны пять растений гороха, сохраняющих характерные фенотипические признаки исходных линий (рис. 2). В контрольных опытах на селективной среде, содержащей канамицинсульфат, морфогенеза не наблюдали.

Устойчивые к канамицинсульфату линии проверяли на наличие неоминифосфотрансферазы в тканях трансгенных линий гороха с помощью антител против этого фермента по методу ELISA. Результаты анализа представлены ниже:

№ линии	Количество NPTII-эквивалента (нг) на 1 мг суммарного белка
1	2,4
2	1,2
3	1,8
4	3,4
5	2,9

Как видно из результатов, все отобранные растения экспрессируют ген *nptII*.

Первичный скрининг трансформантов осуществляли с помощью ПЦР-анализа. Данные приведены на рис. 3. Все предполагаемые трансформанты дают в результате амплификации фрагменты ДНК требуемого размера.

Для доказательства интеграции *Ds*-элемента кукурузы в состав геномной ДНК предполагаемых трансгенных растений гороха использовали метод блоттинг-гибридизации по Саузерну. Суммарную ДНК каждой из полученных линий обрабатывали рестриктазой *BamHI*, фракционировали электрофорезом в 1%-й агарозе, переносили на нейлоновые фильтры и гибридизовали с *KpnI-HindIII*-фрагментом (1,2 тыс. п. н.) плазмиды *SLJ7C3*, содержащим *Ds*-элемент кукурузы (рис. 4).

ДНК всех пяти анализируемых растений гибридизуется с зондом, что свидетельствует об интеграции *Ds*-элемента кукурузы в состав геномной ДНК трансгенных линий гороха. ДНК контрольного нетрансформированного растения с зондом не гибридизуется.

Таким образом, нами получены растения гороха, содержащие *Ds*-элемент кукурузы, и доказана их трансгенность с помощью нескольких биохимических и молекулярно-биологических подходов. На следующем этапе экспериментов мы предполагаем трансформацию полученных растений плазмидой *pIAC*, содержащей ген транспозазы, *Ac*-элемента кукурузы и изучение возможности транспозиции встроившихся *Ds*-элементов.

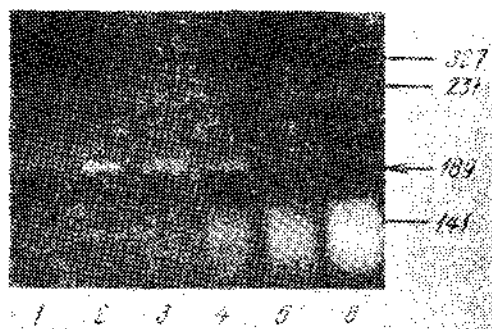


Рис. 3. Анализ продуктов амплификации растительной ДНК трансформированных линий гороха: 1—5 — ДНК трансформированных линий 1—5 соответственно; 6 — ДНК нетрансформированного растения

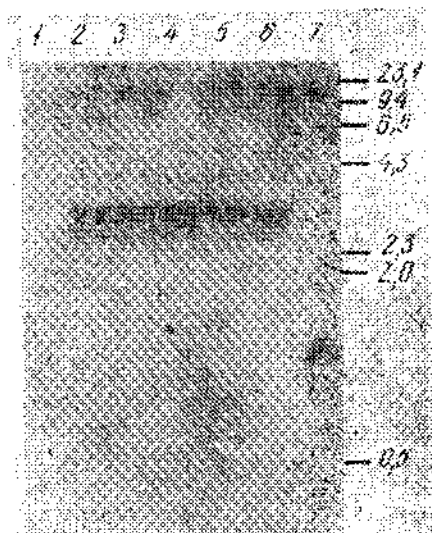


Рис. 4. Саузерн-блоттинг-гибридизация *Bam*HI-перевара суммарной ДНК трансформированных линий гороха с *Kpn*I-*Hind*III-фрагментом плазмиды *SLI7C3*: 1 — ДНК контрольного нетрансформированного растения; 2—6 — ДНК трансгенных линий от 1—5 соответственно; 7 — *Kpn*I-*Hind*III-фрагмент плазмиды *SLI7C3*

Полученные результаты дают возможность использовать систему гетерологичного транспозонового мутагенеза для клонирования уникальных генов такого практически ценного и в то же время хорошо изученного с точки зрения генетики объекта, как горох.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ГКНТ кабинета министров Украины 01.11.02/012-92 и гранта Международного Научного Фонда U.56000.

Л. І. Рачек, С. В. Стороженко, М. В. Кучук

ОТРИМАННЯ І МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM* L.), ЯКІ МІСТЯТЬ *Ds*-ЕЛЕМЕНТ КУКУРУДЗИ

Резюме

Рослини гороху (*P. sativum* L.) з підвищеною регенераційною здатністю трансформували конструкцією, яка містить *Ds*-елемент системи контролюючих елементів *Ac/Ds* кукурудзи. Трансформацію здійснювали кокультивуванням рослинних тканин з *Agrobacterium tumefaciens*. Селекційовано ряд стійких до канаміцисульфату ліній. За допомогою методів ПЦР-аналізу і Саузерн-блоттинг-гібридизації показано інтеграцію *Ds*-елемента до складу геномної ДНК гороху.

OBTAINING AND MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS
TRANSGENIC PEA PLANTS, CONTAINED THE MAIZE Ds-ELEMENT

Summary

Pea plants have been transformed with the gene construction containing *Ds*-element of *Ac/Ds* maize transposon system. The construction was introduced into pea plants using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Several transgenic plants have been selected on the nutritional medium contained the kanamycinsulphate as a selective agent. Concentration of NPTII protein was determined by ELISA assay. Using PCR-analyses and Southern blotting hybridization an integration of *Ds*-element in plant genome has been confirmed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gerats A. G. M., Beld M., Huits H., Prescott A. Gene tagging in *Petunia hybrida* using homologous and heterologous transposable elements // *Develop. Genet.*—1989.—10, N 6.—P. 561—568.
2. Ellis I. G., Finnegan E. G., Lowrance G. J. Developing a transposon tagging system to isolate rust resistance gene from flax // *Theor. and Appl. Genet.*—1992.—85, N 1.—P. 46—54.
3. Haring M. A., Rommens C. M. T., Nikjamp H. J. J., Hille J. The use of transgenic plants to understand transposition mechanisms and to develop transposon tagging strategies // *Plant Mol. Biol.*—1991.—16, N 5.—P. 449—461.
4. Shepherd N. S., Rhoades M. M., Dempsey E. Genetic and molecular characterisation of a-mrf-Mrh, a new mutable system of *Zea mays* // *Develop. Genet.*—1989.—10, N 6.—P. 507—519.
5. Coen E. S., Carpenter R. A semi dominant allele, niv-5257 acts in trans to inhibit expression of its wild-type homologue in *Antirrhinum majus* // *EMBO J.*—1988.—7, N 4.—P. 877—883.
6. Grandbastien M. A., Spielmann A., Caboche M. Tnt 1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics // *Nature.*—1989.—337.—P. 376—380.
7. Tsay Y. F., Frank M. G., Page T. et al. Identification of a mobile endogenous transposon in *Arabidopsis thaliana* // *Science.*—1993.—260.—P. 342—344.
8. Baker B., Schell J., Lorz H., Fedoroff N. Transposition of the maize controlling element «activator» in tobacco // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 4.—P. 4844—4918.
9. Belzile F., Lassner M. W., Tong Y. et al. Sexual transmission of transposed *Ac*-element in transgenic tomato // *Genetic.*—1989.—123, N 5.—P. 181—189.
10. Schmidt R., Willmitzer L. The maize *Ac*-element shows a minimal germinal excision frequency of 0.2 %—0.5 % in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants // *Mol. and Gen. Genet.*—1989.—220, N 12.—P. 11—24.
11. Van Sluys M. A., Tempo J., Fedoroff N. Studies on the introduction and mobility of the maize *Ac*-element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* // *EMBO J.*—1987.—6, N 3.—P. 3881—3889.
12. Izawa T., Miyazaki C., Yamamoto M. et al. Introduction and transposition of the maize element *Ac* in rice (*Oryza sativa* L.) // *Mol. and Gen. Genet.*—1991.—227.—P. 391—396.
13. Sugimoto K., Otsuki Y., Saji S., Hirochika H. Transposition of the maize *Ds* element from a viral vector to the rice genome // *Plant J.*—1994.—5, N 6.—P. 863—871.
14. Houba-Herlin N., Domin M., Pedron J. Transposition of a *Ds*-element from a plasmid into the plant genome in *Nicotiana plumbaginifolia* protoplast-derived cells // *Ibid.*—6, N 1.—P. 55—66.
15. Houba-Herlin N., Becker D., Post A. et al. Excision of a *Ds*-like maize transposable element (*Ac*) in a transient assay in *Petunia* is enhanced by a truncated coding region of the transposable element *Ac* // *Mol. and Gen. Genet.*—1990.—224.—P. 17—23.
16. Chuck G., Robbins T., Nijjar C. et al. Tagging and cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element activator // *Plant Cell.*—1993.—5, N 4.—P. 371—378.
17. Bancroft I., Jones J., Dean C. Heterologous transposon tagging of the DRL1 locus in *Arabidopsis* // *Ibid.*—P. 631—638.
18. Aarts M. G. M., Dirkse W. G., Stiekema W. J., Pereira A. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis* // *Nature.*—1993.—363, N 6431.—P. 715—718.
19. Birnboim C., Doly J. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7, N 2.—P. 1513—1523.
20. Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. A binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid // *Nature.*—1983.—330.—P. 179—180.

21. Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D. R. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria. Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—12.—P. 7347—7351.
22. Зубко Е. И., Кучук Н. В., Туманова Л. Г. и др. Генетическая трансформация гороха, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens* // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 3.—С. 77—80.
23. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res.—1968.—50, N 1.—P. 151—158.
24. Deak M., Kiss G. B., Koncz C., Dudits M. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer // Plant Cell Repts.—1986.—5, N 1.—P. 97—100.
25. Стороженко С. В. Анализ трансгенных растений с помощью полимеразной цепной реакции: пара универсальных праймеров для амплификации последовательности 35S промотора // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 1.—С. 67—72.
26. Murray M. J., Thompson W. E. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res.—1980.—8, N 19.—P. 4321—4325.
27. Nagel R. L., Manners J. M., Birch R. G. Evaluation of an ELISA assay for rapid detection quantification of neomycinphosphotransgenic plants // Plants Mol. Biol. Rep.—1992.—10, N 3.—P. 263—272.
28. Chuch G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 7.—P. 1991—1995.
29. Feinberg A. P., Volgenstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity // Anal. Biochem.—1984.—137, N 5.—P. 266—267.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии
НАН Украины, Киев

Получено 19.12.94