

## Органоспецифічна та світлозалежна експресія генів у трансгенних рослинах: одержання і клонування корене-, бульбо- та листспецифічних промоторів

Л. Г. Льошина, Т. В. Медведєва, О. В. Булко, А. П. Галкін, В. П. Кухар

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України  
Вул. Мурманська, 5, Київ, 02094, Україна

*Досліджено регуляторні послідовності, що забезпечують органоспецифічну та світлозалежну експресію химерних генів у бактеріальних та рослинних клітинах. Вивчено і прокльоновано у плазмідних векторах ділянку, яка відповідає 5'-кінцевій послідовності хлоропластного гену рибосомного білка S12 (rps12), регуляторну ділянку гену пататину  $\lambda pat122$  та промоторну послідовність гену малої субодиниці рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилази (rbcS3A). Показано органоспецифічну активність досліджуваних промоторів. У сконструйовані вектори введено ген металотіонеїну. Виявлено підвищену здатність трансгенних рослин до акумуляції іонів важких металів у клітинах органів з експресією гену металотіонеїну, що вибірково індукується різними промоторами.*

Вступ. Важливим завданням сучасної біотехнології є отримання трансгенних рослин з органоспецифічною експресією чужорідних генів у клітинах, які можна було б використовувати як селекційний матеріал для одержання нових сільськогосподарських культур, надаючи їм таких корисних властивостей, як підвищений вміст поживних білків, стійкість до гербіцидів, вірусних захворювань, комах-шкідників та несприятливих умов довкілля [1–5]. Необхідність подібних робіт обумовлена тим, що практично у кожному випадку бажано, щоб введений ген експресувався лише в конкретному органі чи в певному типі клітин рослини.

Здатність РНК-полімерази ініціювати транскрипцію залежить головним чином від властивостей промотору та прилеглих до нього регуляторних послідовностей [6]. Тому особливий інтерес викликає клонування та структурно-функціональне вивчення промоторів, які ініціюють експресію генів у різних частинах рослини.

Виходячи з цього ми вирішили клонувати три органоспецифічні промотори (коренеспецифічний, бульбоспецифічний та світлозалежний), створити модельні вектори з цими промоторами для введення досліджуваних генів у рослини, проаналізувати функціональні властивості промоторів, оцінюючи ефективність експресії химерних генів хлорамфеніколацетилтрансферази (CAT) та неоміцинфосфотрансферази II (NPT II) [7] у трансформованих рослинах, та, використовуючи отримані результати, вивчити накопичення іонів важких металів у різних частинах трансгенних рослин шляхом клонування химерного гену металотіонеїну (MT) з *Neurospora crassa* під цими промоторами.

Матеріали і методи. Для конструювання транспортних векторів використовували плазмідні *pUC19*, *pSK+*, бактеріальні штами *Escherichia coli*, TG1, HB101 та штам *Agrobacterium tumefaciens* *pGV3850*. ДНК гідролізували, використовуючи ферменти рестрикції та ДНК-модифікуючі ферменти фірм «New England BioLabs» (США), «Serva» (Швеція), «Promega» (США). Роботи з бактеріальними культурами, трансформацію *E. coli*, рестрик-

цію, лігування, введення мітки в ДНК та видалення рекомбінантних плазмід здійснювали за стандартною методикою, як описано у Маніатіса [8]. Первинну структуру ДНК визначали за методом Сенгера [9] з використанням T7-ДНК-полімерази і фрагмента Кльонова.

Ампліфікацію гена проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на приладі TC480 (фірма «Perkin-Elmer Cetus», США). За відомою нуклеотидною послідовністю [10] відбирали відповідні праймери, які, в свою чергу, були отримані за допомогою хіміко-ферментативного синтезу твердофазним Н-фосфатним методом [11]. При отриманні геномної ДНК 50 г рослин швидко заморожували в рідкому азоті, гомогенізували та додавали 2 об'єми буфера (1-й %-й саркозил, 0,25 М сахароза, 50 мМ NaCl, 20 мМ ЕДТА, 50 мМ трис-HCl, рН 8,0) Далі дотримувалися методики, наведеної у Меттлера [12]. Температурний режим для ПЛР підбирали з урахуванням довжини ампліфікованого фрагмента, довжини і складу використаних праймерів. Реакція ампліфікації була запрограмована на один цикл при 97 °С — 5 хв з наступними 30 циклами: гібридизація 50 °С — 1 хв, елонгація 72 °С — 1,5 хв та денатурація при 94 °С — 1 хв і потім ще один кінцевий цикл: гібридизація 50 °С — 1 хв, елонгація 72 °С — 5 хв. Для електрофоретичного аналізу ДНК в 1 %-му агарозному гелі у 1Н TBE буфері (45 мМ трис-борат, 1 мМ ЕДТА, рН 8,0) при 100 В впродовж 2 год брали 1/10 частину суміші з подальшим фарбуванням бромистим етидієм.

Клітини *A. tumefaciens* трансформували прямим методом [13], протопласти — за модифікованою методикою Шиліто [14].

Трансгенні рослини тютюну регенерували і підтримували в культурі за методом Потрікуса [15]. Мікробульбочкові диски картоплі трансформували співкультивуванням з агробактеріальними векторами. На всіх етапах трансформації та регенерації використовували живильне середовище MLS [16]. Селекцію трансформантів у всіх випадках проводили на середовищі з 100 мг/л сульфату канаміцину.

Експресію химерного гена *npt-II* та гена *cat* аналізували за методиками, описаними в лабораторному керівництві під редакцією Дж. Дрейпера та ін. [7].

Комп'ютерний аналіз послідовностей здійснювали за допомогою пакетів програм: «PC-GENE», «DNA-STAR», «DNASIS», «TRANSFAC».

Акумуляцію металів у рослинах визначали після вирощування рослин на MLS середовищі, яке містило 0,86 мг CuSO<sub>4</sub> (200 мкмоль/кг) та 0,2 мг

CdCl<sub>2</sub> (40 мкмоль/кг). Умови вирощування: температура — 26 °С, освітлення 4000 — 5000 лк (18 год на день). Концентрацію металів у рослинах визначали методом атомної адсорбційної спектроскопії («Perkin-Elmer 300»). Клітинні екстракти наносили на колонку з сефадексом G-50 («Pharmacia», Швеція), яку обробляли буфером (25 мМ фосфат калія, рН 7,5).

**Результати і обговорення.** Клонування та дослідження фрагмента геномної ДНК тютюну, що функціонує як коренеспецифічний промотор у трансгенних рослинах. Як джерела промоторних послідовностей звичайно використовують клоновані гени, які функціонують у рослинах. Відомо, що деякі з функціонуючих у рослинах промоторів здатні ініціювати транскрипцію в клітинах *E. coli* [17]. Отже, їх можна відбирати за проявленням функцій у бактеріальних клітинах. Цей підхід використано для клонування послідовностей ядерної ДНК тютюну, що функціонували як промотори в клітинах *E. coli*. Припустили, що деякі з послідовностей могли б функціонувати як промотори і в клітинах рослин [18]. Для перевірки цього припущення випадкові фрагменти геномної ДНК тютюну вбудовували перед кодуючою послідовністю гена *npt-II* без промотору і потенційні промотори виявляли за активністю NPT-II в бактеріальних клітинах. Одна з отриманих конструкцій у плазміді *pDn123t*, що містила вставку довжиною 500 п. н. перед структурною частиною гена *npt-II*, була особливо ефективною в клітинах *E. coli*, тому її використали для трансформації рослин.

Перш за все, було визначено нуклеотидну послідовність досліджуваного фрагмента ДНК та сайт ініціації транскрипції химерного гена в бактеріальних клітинах і в трансгенних рослинах. Внаслідок аналізу нуклеотидної послідовності і блот-гібридизації показано, що клонований фрагмент гібридувався як з ядерною, так і з хлоропластною ДНК. Порівняльний аналіз послідовності з використанням комп'ютерної програми «DNA-STAR» виявив повну гомологію досліджуваного фрагмента з *EcoRI-BglII* послідовністю промоторної частини хлоропластного рибосомного гена *S12* [19]. В подальшому клоновану 5'-ділянку промотороподібної ДНК досліджували на наявність потенційних сайтів зв'язування для різних факторів транскрипції. Для цього використано базу даних TRANSFAC, версія 2.3 (<http://transfac.gbf-braunschweig.de/index.html>). Виявилося, що фрагмент, по-перше, містить послідовності, подібні за структурою до прокаріотичних промоторів (TATA/GA-TG), а саме — до промотору гена тирозинової тРНК *E. coli*: (TATGATG) [20] та промотору гена

5'- GAATTCGAAA GAATTGAACG AGGAGCCGTA TGAGGTGAAA ATCTCATGTA  
 CGGTCTGTG GAGTGGCAGT AAGGGTGACT TATCTGTCAA CTTTCCACT  
 ATCATCCCAA AAAAACCAAA CTCGCTTA CGTAAAGTTG CCAGAGTACG  
 ATTAACCTCT GGATTTGAAA TCACTGCTTA TATACCCGGT ATTGGCCATA  
 ATTTACAAGA ACATTCTGTA GTCCTTAGTAA GAGGGGGAAG GGTTAAGGAT  
 TTACCCGGTG TGAGATATCA CATGTGTCGA GGAACCCTAG ATGCTGTGGG  
 AGTAAAGGAT CGTCAACAAG GCGTCTAG TCGTGTAG ATTCTATCC  
 AAGACTGTG TCATTTATG ATGCCATGTG AATCGCTAGA AACATGTGAA  
 GTGTATGGCT AACCAATAA CGAAAGTTTC GTAAGGGGAC TGGAGCAGGC  
 TACCATGAGA CAAAAGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG ATCGTTTCGC  
 ATG - 3'

Рис. 1. Нуклеотидна послідовність промотороподібного фрагмента ДНК тютюну. Смугами показано потенційні сайти зв'язування, що пояснюють функціонування фрагмента як промотора. Стрілками позначено прямі та інвертовані повтори, які також можуть брати участь у регуляції експресії химерного гена

великої субодиниці рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксілази/оксигенази (РДФК/О) кукурудзи (ТАТ-САТ) [21]. Це пояснює функціонування фрагмента як промотору в бактеріальних клітинах. По-друге, фрагмент містить послідовності, які нагадують блок Гольдберга-Хогнеса в еукаріотичних промоторах, що дозволяє йому функціонувати і в еукаріотичних організмах. По-третє, в нуклеотидній послідовності фрагмента часто зустрічаються блоки нуклеотидів TGTG та TCA, характерні для регуляторних послідовностей [22]. Крім цього, виявлено прямі та інвертовані повтори, які також, імовірно, входять до складу регуляторних елементів, які контролюють експресію підпромоторного гена (рис. 1). Виходячи з цього ми припустили, що ця послідовність здатна ініціювати транскрипцію як у бактеріальних клітинах, так і в клітинах рослин. В результаті трансформації та регенерації протопластів тютюну плазмідною ДНК з геном *npt-II* під досліджувану послідовністю отримано сім стійких до канаміцину рослин, у яких експресію гена *npt-II* визначали за методикою, наведеною в лабораторному керівництві [7]. Для доведення того, що стійкість рослин до канаміцину зумовлена експресією химерного гена *npt-II*, визначали активність ферменту в різних органах рослини (рис. 2). Із викладених вище даних випливає, що активність NPT-II в трансгенних рослинах максимальна в коренях, дещо слабша в стеблах і практично не виявлена в листях. Це свідчить про коренеспецифічний характер експресії гена *npt-II*. Рівень експресії гена, злитого з промоторною послідовністю тютюну, помітно нижчий,

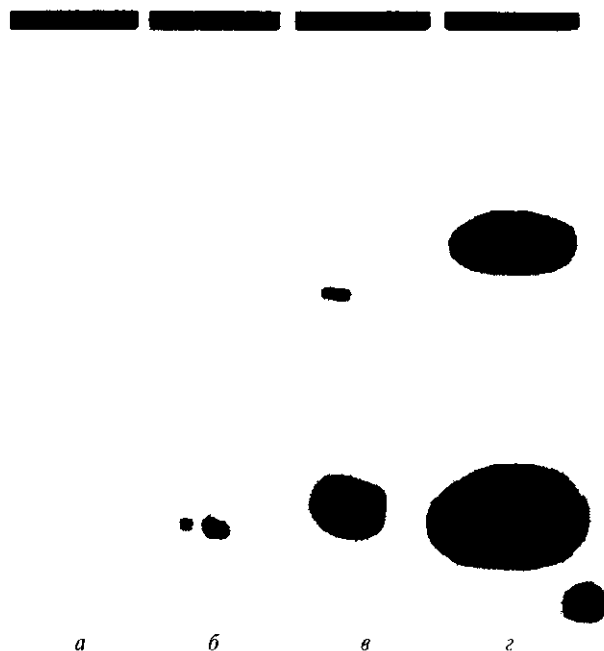


Рис. 2. Визначення активності NPT-II в органах трансгенних рослин тютюну: а — лист; б — стебло; в — корінь трансгенної рослини, що трансформована плазмідною *pDnt23neo*; з — лист контрольної рослини, трансформованої *pLGV23neo*

ніж у випадку позитивного контролю. Розміри білкових продуктів химерних генів *npt-II* як у досліді, так і в контролі приблизно однакові, хоча в досліді молекулярна маса білка дещо вища, а розподілення його в гелі дифузніше. Це може бути пов'язано з відсутністю у плазміді з промоторною послідовністю канонічного еукаріотичного 3'-регуляторного елемента і бути причиною молекулярної негомогенності мРНК і білкового продукту.

Ще одним підтвердженням того, що клонований у векторі фрагмент ДНК хлоропластного геному є промотором, стало дослідження експресії гена *cat*, транскрипційно злитого з цим промотором. Ген *cat* під контролем послідовності *rpS12* було введено до протопластів тютюну в складі плазміді *pUC23-cat* і через 48 год культивування в цих протопластах визначали транз'єнтну експресію введеного гена. На радіоавтографі хроматограми (рис. 3) видно, що досліджуваний екстракт має САТ-активність. Це свідчить про те, що фрагмент ядерної ДНК тютюну плазміді *pDnt23t*, який розташований перед геном *cat* і відповідає фрагменту хлоропластної ДНК, а саме — гену *S12*, має властивості

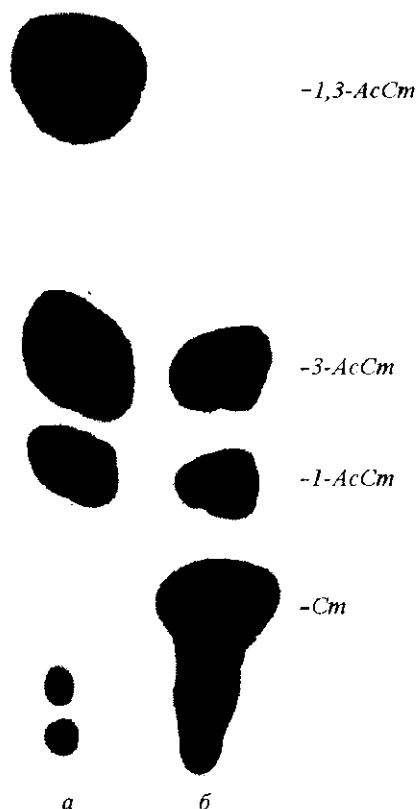


Рис. 3. САТ-активність у рослинних протопластах тютюну, трансформованих вектором *pDnt23cat*: а — контрольні клітини *E. coli*, використані як маркер ацетилюваної форми  $^{14}\text{C}$ -хлорамфеніколу; б — трансформовані протопласти тютюну

промотору і може ініціювати транскрипцію, незважаючи на те, що він не є класичним промотором.

Отримані результати дозволяють припустити, що хлоропластна промотороподібна послідовність виявляється в ядерній ДНК і її промоторна функція може бути активована внаслідок природного або штучного переносу в ядерний геном.

*Аналіз активності продукту репортерного гена під бульбоспецифічним промотором гена пататину в регенерованих трансформантах картоплі.* Ген запасного білка картоплі — пататин — є зручною моделлю для дослідження механізмів органоспецифічної і індукованої експресії в клітинах рослин [23].

Виходячи з того, що ген пататину класу I, позначений як *B33* [24], містить у своєму складі промотор з прямим повтором довжиною 208 п. н. та АТ-збагаченою послідовністю довжиною 37 п. н., яка тандемно повторюється три рази, здатний стимулювати експресію злитого з ним гена в клі-

тинах бульб, а при індукції 7—10 %-ю цукрозою — у клітинах листової тканини [25], було вирішено клонувати промотор пататину аналогічного типу з геномної бібліотеки генів картоплі сорту Зарево. Для скринінгу бібліотеки генів картоплі цього сорту було синтезовано олігонуклеотиди [11], комплементарні консервативній ділянці 5'-кінцевої послідовності повтору 37 п. н. у промоторі гена пататину *B33* (5'-АТТАТАТААТАСТААТАААГА-3'; 3'-ТТАТГАТТАТТТСТТАТСТ-5').

У результаті трьох послідовних скринінгів відібрано клон рекомбінантного фага  $\lambda$ EMBL3- $\lambda$ pat122, який гібридизувався зі специфічним олігонуклеотидним зондом. З цього клону виділили фагову ДНК та здійснили рестрикційне картування клонованої вставки та її блот-гібридизацію з міченим олігонуклеотидним зондом [26].

Порівнюючи рестриктні карти і нуклеотидні послідовності відомих генів пататину класу I, виявлені в комп'ютерному банку нуклеотидних послідовностей EMBL за допомогою програми «PC-GENE», встановлено, що 5'-кінець усіх генів пататину досить консервативний, причому на початку кодуєвої послідовності всіх секвенованих генів класу I знаходиться сайт рестриктази *DraI*. Цей сайт розташований в частині 5'-послідовності генів, яка не транскрибується, через 12—20 п. н. після точки ініціації транскрипції. Внаслідок цього промоторну ділянку гена пататину можна клонувати як *Dra*-фрагмент.

Враховуючи цю обставину, ми клонували *Dra*-фрагмент  $\lambda$ pat122 в плазміді *pBluescript SK(+)* («Stratagene», США) в сайт *SmaI*. Після цього за загальною схемою перенесли промотор у базовий вектор *pDE1* на основі плазміді *pUC19*. Промотор пататину довжиною 1600 п. н. і фрагмент поліаденілювання гена нопалінсинтази (термінатор транскрипції) з'єднували з маркерним геном *cat* по сайту рестрикції *BamHI*. Химерний ген  $\lambda$ pat122-*cat-term(nos)*, фланкований сайтами рестрикції *HindIII*, клонували у відповідний сайт полілінкера бінарного вектора *pBin19*. Цю конструкцію використано для прямої трансформації клітин *A. tumefaciens* штаму *pGV3850*. Рослини-регенеранти проаналізували на наявність експресії гена *cat* у різних органах рослини. Активність продукту введеного гена визначали в листях, коренях і мікробульбах регенерантів.

Як позитивний контроль використовували клітинний екстракт штаму *E. coli*, що містить плазміді *pBR325* з геном *cat*, як негативний — аліквоту реакційної суміші з екстрактом мікробульб не трансформованих рослин, яку наносили на доріжку геля. З хроматограми видно, що максимальна ак-

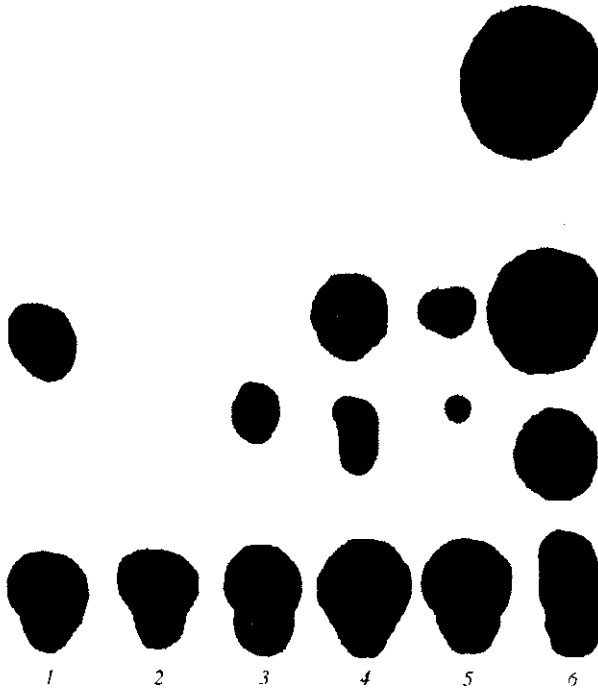


Рис. 4. Аналіз САТ-активності в різних органах трансгенної картоплі: 1 — *pCaMVcat* (мікробульби); 2 — *pat122-cat* (корінь, індукований 8 %-ю сахарозою); 3 — *pat122-cat* (листя, індуковане 8 %-ю сахарозою); 4, 5 — *pat122-cat* мікробульби двох різних рослин (простежується САТ-активність); 6 — контрольні клітини *E. coli*, використані як маркер ацетилюваної форми  $^{14}\text{C}$ -хлорамфеніколу

тивність САТ спостерігається в мікробульбах трансформованих рослин картоплі і практично відсутня у тканинах листя і в корені (рис. 4) Цей факт підтверджує, що клонований промотор гена пататину забезпечує бульбоспецифічну експресію гена *cat*. Відсутність експресії в коренях дає можливість віднести промотор гена пататину *λpat122* до класу I сімейства пататинових генів, оскільки відомо, що гени пататину класу I здатні забезпечувати високі рівні експресії винятково в бульбах [25, 27].

Вищенаведені результати аналізу експресії гена *cat* отримані у рослин, які вирощували на поживних середовищах з мінімальним вмістом цукрози: 5 % для індукції бульбоутворення та 2 % для регенерації паростків на першій стадії трансформації рослин. Але відомо, що функціонування генів пататину класу I не лише органоспецифічне, а й

регулюється вмістом сахарози в культуральному середовищі. Так, показано, що зростання рівня сахарози до 8 % індукує підвищену експресію генів пататину класу I у листовій тканині [25]. Для вивчення впливу сахарози на роботу химерного гена *λpat122-cat* отримано трансгенні рослини на середовищах з концентрацією сахарози 8 % та здійснено аналіз активності ферменту, ген якого регулюється досліджуваним промотором. З'ясувалося, що в одержаних рослинах-регенерантах модифіковане середовище індукувало експресію САТ у листі, але вона була значно слабшою, ніж у коренях (рис. 4).

Таким чином, можна стверджувати, що клонована послідовність *λpat122* належить до пататинових промоторів класу I і містить в собі необхідну інформацію для забезпечення бульбоспецифічної експресії химерних генів.

Клонування промотору, що спрямовує світлозалежну експресію в регенованих рослинах тютюну. Процес фотосинтезу, що відбувається всередині хлоропластів, перетворює енергію світла на енергію, яку рослина безпосередньо використовує у формі цукру. РДФК/О — ключовий фермент фотосинтезу — являє собою мультисубодиничний білок, велика субодиниця (*rbcL*) якого кодується хлоропластним геномом, а мала (*rbcS*) — ядерним. Інtronно-екзонна структура генів РДФК/О має високу консервативність послідовностей та розміру. У цих генів регуляторні ділянки також висококонсервативні. Вони переключають гени під дією світла/темряви за допомогою фітохромів і забезпечують світлоіндуковану та органоспецифічну регуляцію рослин [28—30]. Враховуючи ці положення, було вирішено клонувати за допомогою ПЛР аналогічний промотор, який би скеровував світлозалежну експресію генів у рослинних організмах. Для ампліфікації відібрано послідовність промотору гена *rbcS-3A* томата, яку попередньо було секвеновано [10].

Після аналізу послідовності промотору для праймерів відібрано такі олігонуклеотиди: 5'-GAT-TGAGTGAATGGACTTTTTGTGC-3' (положення від -1076 до -1051); 5'-AAGAGGGTTATTGCTT-TCTAGTCTCTCT-3' (положення від +8 до -18). У результаті ПЛР з використанням цих праймерів та геномної ДНК томатів сорту Киргизький отримано фрагменти ДНК довжиною 1094 п. н. (рис. 5). Для визначення існуючих у відомій послідовності сайтів рестрикції використовували комп'ютерну програму «DNASIS». Аналіз здійснювали за допомогою екзонуклеаз *AluI* і *RsaI*. Рестрикційне картування та секвенування підтвердили, що ампліфіковані фрагменти відповідають промоторній послідовності гена

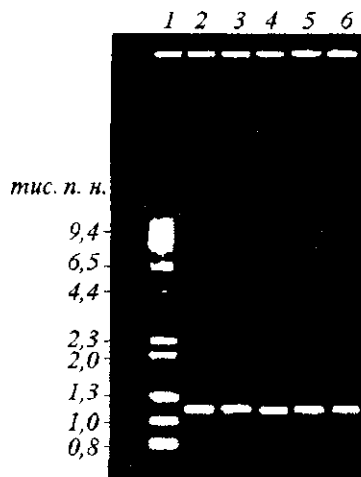


Рис. 5. Результати полімеразної ланцюгової реакції: 1 — маркер (ДНК фага  $\phi$ X174, гідролізована рестриктазою *HaeIII*); 2—6 — фрагмент промоторної послідовності гена *rbcS3A* довжиною 1094 п. н.

*rbcS-3A* томата. Порівняння консервативних 5'-промоторних ділянок відомих генів *rbcS-3A* томата з отриманою послідовністю показало, що досліджувана послідовність містить передбачений ТАТА бокс (-32 ТАТАААТ-26 від місця ініціації транскрипції) та потенційну СААТ ділянку (-98 СГААТ-93), які беруть участь у зв'язуванні РНК-полімерази II. Відмінні між відомими та ампліфікованим фрагментами проявляються головним чином у точкових мутаціях, які істотно не впливають на їхнє функціонування як промоторів.

Отриманий фрагмент клоновано в плазміді *pSKBluescript(+)* по сайтах упізнавання рестриктазою *SmaI*, з якої його надалі вирізали по *EcoRI* та *BamHI*.

Загальну схему конструювання експресуючого вектора наведено на прикладі плазміді, що містить касету *rbcS-CAT-term* (рис. 6).

Для цього як базовий обрано вектор *pUC19*, у якому по *BamHI*- і *HindIII*-сайтах полілінкеру вбудували фрагмент поліаденілювання гена нопалінсинтази *Ti*-плазміді (термінатор транскрипції — *term*) із вектора *pLGV23neo*. Нова конструкція отримала термінуючу послідовність, фланковану *BamHI*- та *HindIII*-сайтами, перед якими знаходяться сайти для ферментів *EcoRI* та *NarI* (останній є ізошизомером *EheI*). У гідролізований сайт *EheI* вбудували нефосфорильований лінкер *HindIII*. В результаті полілінкер та термінатор стали обмеженими *HindIII*-сайтами. Далі в цю плазміді по сайтах *EcoRI* і *BamHI* спрямовано вводили промотор *rbcS*, проклонований раніше по

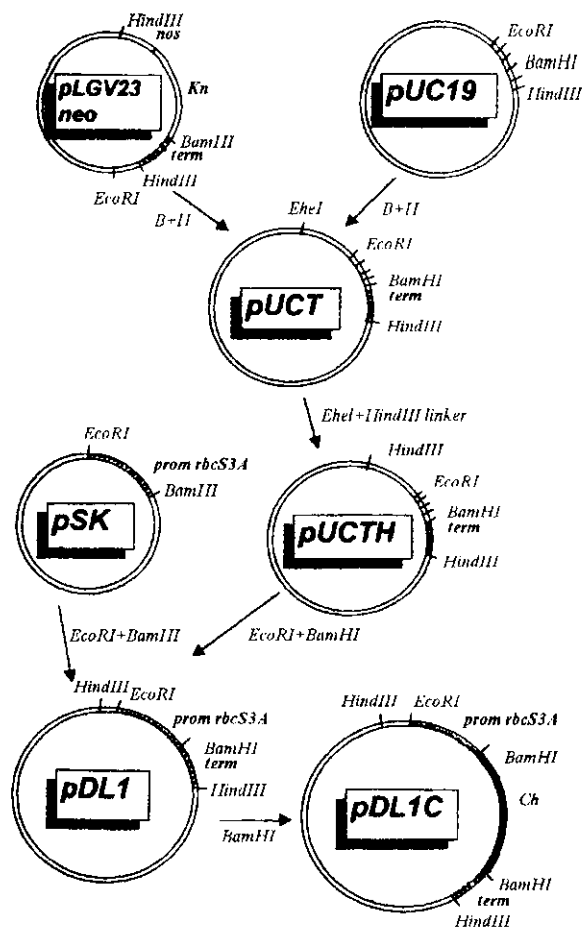


Рис. 6. Схема конструювання вектора *pDL1C*, який містить маркерний ген *cat* під промотором *rbcS*

*SmaI*-сайтах у векторі *pSK(+)*. Таким чином, ми отримали вектор, який між промотором та термінуючою послідовністю містить унікальний сайт *BamHI*, у який можна вбудувати маркерні або досліджувані гени (в даному випадку — це маркерний ген *cat*). Орієнтацію злитого гена у векторі визначали рестрикційним аналізом за допомогою сайтів *EcoRI*, що містяться як у гені, так і в плазміді. Химерну касету *rbcS-cat-term* вирізали з вектора *pDL1* по сайтах рестрикції *HindIII* і клонували у відповідний сайт полілінкеру бінарного вектора *pBin19*, який методом прямої трансформації вводили до клітин *A. tumefaciens* штаму *pGV3850*. Трансформанти відбирали за стійкістю до канаміцину та хлорамфеніколу. Отриманими штамами агробактерій інфікували листові диски тютюну, відбирали стійкі до вищезгаданих антибіотиків клони, з яких регенерували дорослі рослини. Для

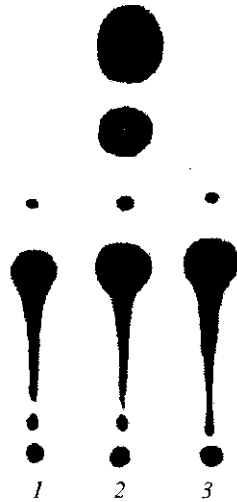


Рис. 7. Аналіз САТ-активності в рослинах, трансформованих плазмідом *pDLIC*: *a* — корінь; *b* — листя; *в* — контрольний екстракт *E. coli*, використаний як маркер ацетилюваної форми  $^{14}\text{C}$ -хлорамфеніколу

доказу наявності маркерного гена у трансформованих рослинах на рівні транскрипції та в різних органах рослини використовували метод визначення САТ-активності. Результати аналізу показали наявність активності ферменту у листовій тканині та її відсутність у коренях рослини (рис. 7).

В останні роки з'явилися повідомлення про новий маркерний ген, застосування якого не потребує використання радіологічних методів дослідження. Мова йде про зелений білок, який флуоресцює (GFP — green fluorescent protein), медузи *Aequorea victoria*. Це перший приклад клонованого маркерного білка, який має власне флуоресцентне свічення. Серед його переваг можна відмітити такі, як стабільна флуоресценція, яка не вимагає додаткових екзогенних кофакторів і субстратів, нетоксичність для клітини-господаря, малий розмір (27 кДа) та відносно проста можливість тестування за допомогою УФ світла. GFP придатний для використання як флуоресцентна мітка генів при вивченні їхньої експресії та транспорту в рослинній клітині [31, 32].

Кодуюча послідовність *GFP* гена була вбудована нами в експресуючий вектор під подвійним промотором *rbcS-35SCaMV* з подальшою трансформацією цим вектором клітин тютюну. Але отримані рослини мали слабе забарвлення. Очевидно, що введена касета негативно впливала на фотосинтезуючий апарат та продукцію хлорофілу. Це явище ще потребує детального дослідження.

*Органоспецифічна експресія химерного гриб-*

*ного гена металотіонеїну в трансгенних рослинах.* Проблема забруднення довкілля і родючих ґрунтів важкими металами призводить до поглинання цих металів рослинами та подальшого потрапляння їх у харчові продукти, що становить серйозну загрозу здоров'ю людей і спричинює загибель самих рослин.

У клітинах більшості видів хребетних тварин та грибів важкі метали зв'язуються і таким чином інактивуються спеціалізованими низькомолекулярними цистеїнбагатими білками — металотіонеїнами [33]. В рослинах подібних білків немає, і зв'язування важких металів здійснюється фітохелатинами — невеликими пептидами, які не є продуктами генів і не можуть бути такими ефективними, як МТ. Тому проблема отримання та дослідження рослин з такими якостями є дуже актуальною [34—36].

Наше дослідження спрямоване на вивчення можливості підвищення акумуляції важких металів у різних частинах рослин. Для цього ген МТ з *N. crassa* (царина *Fungi*, клас *Ascomycetes*, родина *Sordariaceae*), послідовність якого відома, синтезували хіміко-ферментативним методом у дві стадії [11] і вбудовували у вектори: *pDnt23t* — під коренеспецифічний промотор *rpS12*; *pDEI* — під бульбоспецифічний промотор *λpat122*; *pDLI* — під світлозалежний промотор *rbcS*. Згідно з літературними даними [34], найшвидше перевірити експресію генів, які забезпечують стійкість до іонів важких металів, можна, проаналізувавши, як трансгенні рослини ростуть на середовищі, що містить досліджуваний метал (у нашому випадку Cd та Cu). Концентрацію металу в рослинах визначали методом атомної адсорбційної спектроскопії. Дані експерименту представлено в таблиці.

Летальні дози досліджуваних металів (Cu-200, Cd-40 ммоль/кг) викликали у контрольних рослин (тютюну та картоплі) потемніння листя та їхню загибель протягом чотирьох днів. Рослини, трансформовані геном МТ під контролем *35S* промотора, росли нормально, але дещо повільніше, ніж контрольні, на середовищі без вмісту металу. На 15-й день у всіх рослин спостерігалася поява коренів (для порівняння: нормальні рослини в нетоксичному середовищі утворювали корені на 8-й день). У трансформантів картоплі під контролем пататинового промотору коренева система розвивалася недостатньо, але в деяких з них відбувалося бульбоутворення. Розвиток пагонів також був слабким, але рослина виживала. Рівень акумуляції важких металів у коренях тютюну та бульбах картоплі досягав критичної величини порівняно з рослинами, що містили МТ ген під *35S* промотором.

Концентрація важких металів у трансгенних рослинах на 25-й день експерименту

Рослина Орган рослини	Промотор перед геном металотіонеїну	Концентрація, ммоль/кг	
		Cu <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>
Картопля			
Бульби	35S	38	9
Листя	—	87	28
Бульби	Пататин	91	29
Листя	<i>rbcS</i>	83	40
Тютюн			
Корінь	35S	27	5
Листя	—	48	15
Корінь	<i>rps12</i>	38	17
Листя	<i>rbcS</i>	42	18

Рослини тютюну з експресією МТ гена під коренеспецифічним промотором розвивалися наступним чином: ріст надземної частини сповільнювався (затримка в рості була порівнянною з контрольними рослинами), корені утворювалися на рівні рослин з 35S промотором.

У тютюну і картоплі з експресією МТ гена під світлозалежним промотором спостерігався непропорційний розвиток морфологічних ознак. Коли зелена надземна частина рослин розвивалася нормально, формування коренів не спостерігалось. На межі надземної та підземної частин рослин формувалася калусна тканина. На поверхні пагонів з'являлися повітряні кореневі утворення. Рівень акумуляції металів був схожий з таким у рослин, що містили 35S промотор.

Результати експерименту засвідчили, що всі рослини, трансформовані геном металотіонеїну, набули стійкості до підвищеної концентрації іонів важких металів у живильному середовищі. В залежності від експресії МТ гена спостерігалася селективна толерантність до шкідливого впливу металів у різних органах трансформантів. Порівняно з контролем рослини, що містили ген МТ, витримували підвищену в 2—3 рази концентрацію важких металів. Нетрансформовані тканини та рослини гинули на модифікованому середовищі в перші дні після проростання.

Аналізуючи результати, отримані після вивчення акумулюючих властивостей трансгенних рослин, ми встановили, що 35S промотор та промотор *rbcS* забезпечують приблизно однаковий рівень експресії гена МТ у трансформантах, але рослини,

що містять світлозалежний промотор, менш життєздатні внаслідок слабо розвиненого кореневої системи. У випадку з *rps12* та *λpat122* промоторами експресія МТ в бульбах та коренях значно вища, ніж у рослин з 35S промотором. Взагалі досить високий рівень акумуляції трансформантами іонів важких металів за допомогою цих промоторів дає підставу для використання таких трансгенних рослин для біоремедитації забруднених ґрунтів.

Таким чином, при обговоренні отриманих результатів необхідно ще раз наголосити на винятковій важливості дослідження регуляторних послідовностей, які контролюють транскрипцію рослинних генів, не лише для розуміння процесів, що відбуваються в клітинах, а й для вирішення біотехнологічних завдань, особливо тоді, коли необхідно експресувати ген у певному типі клітин. Нами клоновано одночасно три промотори, специфічні для різних частин рослини: коренеспецифічний промотор помірної сили рибосомного гена тютюну (*rps12*); бульбоспецифічний сильний промотор класу I гена пататину картоплі (*λpat122*); листспецифічний промотор малої субодиниці РДФК томата, дія якого обумовлена світлом (*rbcS-3A*).

Для отримання коренеспецифічного промотору ми використали нетрадиційний підхід, який був пов'язаний з відбором послідовностей з рестриктних фрагментів геномної ДНК, що функціонують як промотори перед маркерними генами *E. coli* і в трансгенних рослинах; пататинового промотору, клонованого класичним шляхом — відбором з геномної ДНК за допомогою гібридизаційних зондів, комплементарних певним ділянкам промотору пататину; промотору РДФК — за допомогою специфічних праймерів та реакції полімеразного копіювання відібраних фрагментів ДНК. Клоновані промотороподібні ділянки ДНК ідентифікували шляхом конструювання спеціальних плазмідних векторів, які містять модельні гени під цими послідовностями, генетичної трансформації клітин рослин цими плазмідами, отримання з трансформованих клітин трансгенних рослин-регенерантів і вивчення експресії химерних генів в окремих частинах рослин. Належність клонованих послідовностей до промоторів доведено не лише за їхніми функціями, а й за наявності в їхній первинній структурі регуляторних ділянок, які характерні для про- та еукаріотичних промоторів, описаних у літературі. Отримано також докази на користь того, що тканинспецифічна експресія гена металотіонеїну гриба відбувається в трансгенних рослинах під органоспецифічними та світлоіндукованими промоторами.



L. G. Ljoshina, T. V. Medvedeva, O. V. Bulko, A. P. Galkin, V. P. Kukhar

Organ-specific and light-inducible expression of genes in transgenic plants: receiving and cloning root-, tuber- and leaf-specific promoters

#### Summary

In this study the regulatory sequences ensuring organ-specific and light-dependent expression of several chimerical genes in bacterial and plant cells have been received and investigated. A fragment corresponding to the 5'-end sequence of the chloroplast ribosomal gene *S12* (*rpS12*), a regulatory fragment of the patatin gene *lpat122*, a promoter sequence of the gene of small subunit of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase (*rbcS3A*) have been extracted and cloned in vectors containing marker genes. The organ-specific activity of the cloned promoters has been shown. The metallothioneine gene has been introduced into the vector constructed. The increased ability of transgenic plants to accumulate the ions of heavy metals in organ's cells with selective promoter-induced expression of the metallothioneine gene has been demonstrated.

Л. Г. Лешина, Т. В. Медведева, О. В. Булко, А. П. Галкин, В. П. Кухарь

Органоспецифическая и светозависимая экспрессия генов в трансгенных растениях: получение и клонирование корне-, клубне- и листспецифических промоторов

#### Резюме

Исследованы регуляторные последовательности, обеспечивающие органоспецифическую и светозависимую экспрессию химерных генов в бактериальных и растительных клетках. Фрагмент, соответствующий 5'-концевой последовательности хлоропластного гена рибосомного белка *S12* (*rpS12*), регуляторный фрагмент гена пататина *lpat122*, промоторная последовательность гена малой субъединицы рибулозо-1,5-дифосфаткарбокислазы (*rbcS3A*) выделены и проклонированы в плазмидных векторах. Выявлена органоспецифическая активность полученных промоторов. В сконструированный вектор введен ген металлотхионеина. Показана повышенная способность трансгенных растений к аккумуляции ионов тяжелых металлов в клетках органов с избирательной промотор-индуцируемой экспрессией гена металлотхионеина.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Streber W. R., Willmitzer L. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzymes are resistance to 2,4D // Bio-Technology.—1989.—7.—P. 811—816.
2. Vaeck M., Reynaerts A., Hofte H. Transgenic plants protected from insect attack // Nature.—1987.—328.—P. 33—37.
3. Ebskamp M. J. M., van der Meer I. M., Spronk B. A., Weisbeek P. J. Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco // Bio-Technology.—1994.—12.—P. 272—275.
4. Sano T., Nagayama A., Ogawa T., Ishida I., Okada Y. Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid // Nature Biotechnol.—1997.—15, N 12.—P. 1290—1294.
5. Tacke E., Salamini F., Rohde W. Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection // Nature Biotechnol.—1996.—14, N 11.—P. 1597—1601.
6. Walden R., Schell J. Techniques in plant molecular biology — progress and problems // Eur. J. Biochem.—1990.—192, N 2.—P. 563—576.
7. Дрепнер Дж., Скотт Р., Армидж Ф., Уолден Р. Генная

инженерия растений. Лабораторное руководство.—Москва: Мир, 1991.—408 с.

8. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1987.—352 p.
9. Hindley J., Staden R. DNA sequencing.—Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier Biomed. press, 1983.—384 p.
10. Ueda N., Pichersky E., Malik S. V., Coshmore A. A. Level of expression of the tomato *rbc-3A* gene is modulated by a far upstream promoter element in a developmentally regulated manner // Plant Cell.—1989.—1.—P. 217—227.
11. Dubey I. Ya., Lyapina T. V., Galkin A. P., Fedoryak D. M. Obtaining of highly efficient polymer support for the synthesis of the DNA fragments on the basis of the microspheric silica «Silochrom-2» // Биополимеры и клетка—1993.—9, № 4.—P. 26—31.
12. Mettler A. A small and rapid method for minipreparation of DNA from tissue cultured plant cells // Plant Mol. Biol. Rep.—1987.—5, N 3.—P. 346—349.
13. Burow M. D., Chlan C. A., Sen P., Lisca A. High-frequency generation of transgenic tobacco plants after modified leaf discs co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Mol. Biol. Rep.—1990.—8, N 2.—P. 124—139.
14. Shillito R. D., Paszkowski J., Potrykus I. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species // Plant Cell Rep.—1983.—2.—P. 244—247.
15. Potrykus I., Shillito R. D. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration // Meth. Enzymol.—1985.—118.—P. 549—577.
16. Медведева Т. В., Ефименко И. М. Использование микроклубневых дисков для трансформации картофеля посредством клубнеспецифических векторов на основе *Agrobacterium tumefaciens* // Физиология и биохимия культур растений.—1997.—29, № 3.—С. 187—193.
17. Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cell using Ti-plasmid derived vector // Nature.—1983.—303, N 5914.—P. 209—213.
18. Доманский Н. Н., Генинг Л. В., Галкин А. П., Газарян К. Г. Клонирование последовательностей ядерной ДНК *Nicotiana tabacum*, функционирующих как промоторы в клетках *Escherichia coli* // ДАН СССР.—1986.—21, № 4.—С. 151—154.
19. Grgzelyak N. V., Galkin A. P., Gening L. V., Medvedeva T. V. Chloroplast «cryptic» promoter can be activated upon their transfer to plant nuclear genome // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 6.—С. 87—93.
20. Pribnow D. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72, N 3.—P. 784—788.
21. Bohnert H. J., Crouse E. J., Schmitt J. M. Organization and expression of plastid genomes // Nucleic acids and proteins in plants II.—Berlin; Heidelberg: Springer, 1982.—P. 530.
22. Nussinov R. Some guidelines for identification of recognition sequences: regulatory sequences frequently contain TG-TG/CAC(A), TGA/TCA and (T)CTC/GAG(A) // Biochim. et biophys. acta.—1986.—866, N 14.—P. 93—108.
23. Mignery C. A., Pikaard C. S., Park W. D. Molecular characterization of the patatin multigene family of potato // Gene.—1988.—62.—P. 27—44.
24. Rocha-Sosa M., Sonnewald U., Frommer W., Stratmann M. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene // EMBO J.—1989.—8, N 1.—P. 23—29.
25. Liu X. Y., Prat S., Willmitzer L., Frommer W. B. Cis-regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-in-

- ducible expression of a chimeric class I patatin promoter GUS-gene fusion // *Mol. and Gen. Genet.*—1990.—223, N 3.—P. 401—406.
26. Yefimenko I. M., Medvedeva T. V., Kovalenko P. G., Gazaryan K. G., Galkin A. P. Organ-specific gene expression in transgenic potato: the cloning a new promoter of a class I patatin gene // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 6.—P. 96—103.
27. Paiva E., Lister P. M., Park W. D. Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles // *Plant Physiol.*—1983.—71.—P. 616—618.
28. Manzara T., Gruijssem W. Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants // *Photosyn. Res.*—1988.—16.—P. 117—139.
29. Herrera-Estrella L., Van der Broek G., Maenhaut R., Van Montagu M. Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a *Ti*-plasmid vector // *Nature.*—1984.—310.—P. 115—120.
30. Morelli C., Nagy F., Fraley R. T., Rogers S. G. A short conserved sequence is involved in the light-inducibility of a gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea // *Nature.*—1985.—315.—P. 200—204.
31. Haseloff J., Amos B. GFP in plants // *TIG.*—1995.—11, N 8.—P. 328—329.
32. Pang S. Z., Deboer D. L., Wan G. B., Ye G. B. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants // *Plant Physiol.*—1996.—112.—P. 893—900.
33. Kagi J. H. R., Schaffler A. Biochemistry of metallothionein // *Biochemistry.*—1988.—27, N 23.—P. 8509—8515.
34. Misra S., Gedman L. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants // *Theor. and Appl. Genet.*—1989.—78.—P. 161—168.
35. Raskin I., Kumar P. B. A. N., Duchekov S., Saft D. E. Bioconcentration of heavy metals by plants // *Curr. Opin. Biotechnol.*—1994.—5.—P. 285—290.
36. Rauser W. E. Metal-binding peptides in plants // *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants.*—Amsterdam: SPB Acad. publ., 1993.—P. 239—250.

УДК 577.214.625

Надійшла до редакції 19.02.02