УДК 577.218+602.6

ОТРИМАННЯ РОСЛИН-ТРАНСФОРМАНТІВ, ЩО НЕСУТЬ РЕПОРТЕРНИЙ ГЕН ПІД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРА *APX2*

Т. О. РУСНАК, І. І. ПАНЧУК

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Аскорбатпероксидаза (APX) являє собою фермент, що бере участь у захисті рослинних клітин від оксидативного стресу. У Arabidopsis thaliana, APX кодується малою мультигенною родиною, що включає 8 генів. 8 ізоформ APX присутні в хлоропластах, пероксисомах і цитозолі та диференційно активуються у відповідь на абіотичний стрес. Apx2 є типовим стрес-індукованим геном, який експресується тільки за стресових умов. Для того, щоб з'ясувати стрес-залежну експресію промотора гену Apx2 в різних органах і тканинах A. thaliana, ця ділянка була ампліфікована за допомогою ПЛР та клонована. Промотор був об'єднаний з репортерним геном uidA, що кодує β-глюкоронідазу та введений в рослини A. thaliana дикого типу, з використанням методу агробактеріальної трансформації. Трансгенні рослини були ідентифіковані за допомогою гербіциду BASTA. Наявність рекомбінантного конструкту у рослин було підтверджено за допомогою ПЛР. В цілому було відібрано 7 незалежних ліній, в складі яких містився рекомбінантний конструкт Pro-APX2: GUS.

Ключові слова: промотор Apx2, бінарний вектор, трансгенні рослини, BASTA, репортерний ген

Вступ. Для рослинних організмів характерна наявність мультигенних родин. Причиною цього є те, що ферменти які кодуються членами цих родин функціонують у різних клітинних компартментах та у різних рослинних тканинах (Arondel et al., 2000; Li et al., 2002; Chen et al., 2011; Grégoire et al., 2012).

Одну з мультигенних родин утворюють гени, що кодують аскорбат пероксидазу (APX) – фермент, що розщеплює пероксид водню і відіграє важливу роль у захисті клітини від оксидативного стресу. У арабідопсису відомо 8 генів, що кодують цитозольні, хлоропластні та мікросомальні ізоформи APX (Shigeoka et al., 2002; Dabrowska et al., 2007). Наявність декількох ізоформ APX вказує на їх індивідуальну спеціалізацію, яка пов'язана з функціонуванням у різних клітинних компартментах, диференційною експресією в онтогенезі (Dabrowska et al., 2007; Panchuk et al., 2002). Згідно сучасним уявленням *Apx2* є типовим стресовим геном, який кодує цитозольну ізоформу APX. Транскрипти *Apx2* практично відсутні у клітині за оптимальних умов культивування, але рівень їх різко зростає в умовах стресу. Зокрема за дії теплового шоку експресія *Apx2* може зростати у тисячі разів (Panchuk et al., 2002). Було показано, що крім того експресія *Apx2* зростає за дії абсцизової кислоти, сольового та осмотичного стресів, а також у відповідь на поранення та в умовах надмірного освітлення (Karpinski et al., 1997; Chang et al., 2004; Rossel et al., 2006; Galvez-Valdivieso et al., 2009; Suzuki et al., 2012). Поряд з цим низка інших абіотичних факторів, зокрема підвищені концентрації іонів важких металів та дія гербіциду паракват не впливає на експресію *Apx2*.

Вважається, що експресія *Apx2* контролюється транскрипційними факторами HSF (Heat Shock Transcription Factor) (Panchuk et al., 2002) та Zat10 (Mittler et al., 2006). Проте, регуляція експресії гену *Apx2* у різних органах та тканинах рослин залишається не вивченою. Тому метою нашої роботи, було створення рекомбінантного конструкту, що містить репортерний ген під контролем промотора *Apx2* та трансформація отриманої рекомбінантної ДНК у *A. thaliana* для подальшого вивчення характеру його експресії у різних органах рослини за дії теплового стресу.

Матеріали та методи. Рослинну ДНК виділяли використовуючи лізуючий буфер, який містив: 3% цетавлон; 20 мМ ЕДТА; 5М NaCl та 1М трис-HCl. Отриману ДНК використовували як матрицю у ПЛР. Для ампліфікації промоторної ділянки гену *Apx2* використовували праймери APX2-DON (GATATGCTACGTTTT TACATCTCCATTTCTTACTTCG) та APX-PB (CTATACGCGTTTTTTCAAATTCGCTTCCTTC), які містили на 5 кінці додатковий сайт впізнавання для рестриктази *Mlu* I, необхідний для клонування у векторну плазміду pLitmus38. Кількість ДНК для проведення ПЛР складала близько 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1х буфер

для ПЛР (Phusion HF Buffer, Finnzymes), суміш dNTP – 0.2 мМ кожного, праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (Phusion DNA Polymerase, Finnzymes) – 1 од. активності на реакцію та 25 мМ $MgCl_2$. Загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл.

ПЛР проводилася з використанням приладу MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95ºС, 2 хв; (2) денатурація ДНК – 94ºС, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 56ºС, 50 с; (4) синтез ДНК – 72ºС, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації – 72ºС, 1 хв; (6) припинення реакції – 4ºС. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Для аналізу результатів ПЛР використовували електрофорез у 1% агарозному гелі. Продукти ПЛР реакції обробляли рестриктазою *Mlu* I, лігували у pLitmus38 та перевіряли ідентичність клонованої послідовності сиквенуванням. Після цього промоторну ділянку *Apx2* переклоновували у бінарний вектор pGPTV, який містив репортерний ген *uidA*, що кодує β-глюкоронідазу (GUS).

Лігування проводили з використанням Т4 ДНК лігази (Fermentas, Литва). Лігазну суміш інкубували за 22ºС протягом двох годин. Продукти лігування трансформували у компетентні клітини лінії *Escherichia coli* лінії XL-blue або *Agrobacterium tumifaciens* лінії GV3101 методом електропорації з використанням приладу *E. Coli* Pulser (BioRad, США). Присутність вставки у складі рекомбінантних плазмід підтвердили методом рестриктазного картування або з використанням ПЛР.

Визначення довжини продуктів рестриктазної реакції або ПЛР здійснювали в 1 % агарозному гелі. В якості ДНК-маркера використовували GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix (Fermentas). Візуалізацію ДНК проводили в ультрафіолетовому світлі з використанням програмного забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Сиквенування отриманих рекомбінантних плазмід проводили з використанням Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Пошук послідовностей у Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST.

Для трансформації використовували квітучі рослини *Arabidopsis thaliana*, екотип Col 0. Трансформацію гаметофітів рослин проводили методом вакуумної інфільтрації. Трансформацію проводили з використанням інфільтраційного середовища, в склад якого входить: 0.5X поживне середовище Мурасіге-Скуга; вітамін B5 112мг/л; 5% сахароза; 0.005% Silwet Gold; 0.44 мкМ БАП (Bechtold et al., 1993).

Для скринінгу рослин-трансформантів використовували гербіцид BASTA у концентрації 1 мл/л.

Результати та обговорення. Першим кроком нашої роботи було отримання ДНК повнорозмірного промотора *Apx2* шляхом ПЛР ампліфікації. Для цього нами було проведено пошук нуклеотидних послідовностей для гену *Apx2* арабідопсису у базі даних Genbank. Знайдену послідовність було проаналізовано, визначено границі промотора та створено праймери для ампліфікації.

Електрофоретичний аналіз отриманих ПЛР-продуктів показав наявність лише одного ампліфікату. Його довжина становила 741 пн, що відповідає теоретично очікуваному розміру.

Отримані ампліфікати обробляли рестриктазою *Mlu* I та клонували у бактеріальний вектор pLitmus38. Використання методу *blue-white colony selection* для скринінгу, що дало можливість ідентифікувати серед бактерій-трансформантів 25 білих колоній, 4 з яких (A-01, A-02, A-03, A-04) було відібрано для подальшої роботи. Після виділення із цих колоній рекомбінантних плазмід їх обробляли рестриктазою *Mlu* I. Після електрофоретичного аналізу отриманих продуктів рестрикції в кожному випадку було ідентифіковано по два фрагмента, довжина одного з яких відповідала довжині вектора, а іншого – очікуваній довжині ПЛР продукту промотора *Apx2*, що клонувався.

Для перевірки ідентичності клонованої ДНК промотора *Apx2* було проведено сиквенування двох рекомбінантних плазмід – pApx2_A-01 та pApx2_A-02. Порівняння отриманих сиквенсів показало, що послідовність обох клонів була ідентичною з наявною у Genbank, що дозволило використати ці клони для подальшої роботи.

Для трансформації рослин необхідно було мати послідовність промотора *Apx2*, яка контролює експресію репортерного гену *uidA*. Щоб створити відповідний рекомбінантний конструкт (рис. 1), необхідно було у бажаній орієнтації перенести клонований нами промотор *Apx2* до складу бінарного вектору pGPTV-BAR (Becker et al., 1992). Для забезпечення направленного клонування було розроблено пару праймерів які додатково несли на 5-кінці із сайтами впізнавання різних рестриктаз. Прямий праймер містив сайт впізнавання рестриктази *Nhe* I, а зворотній – для *Mlu* I.

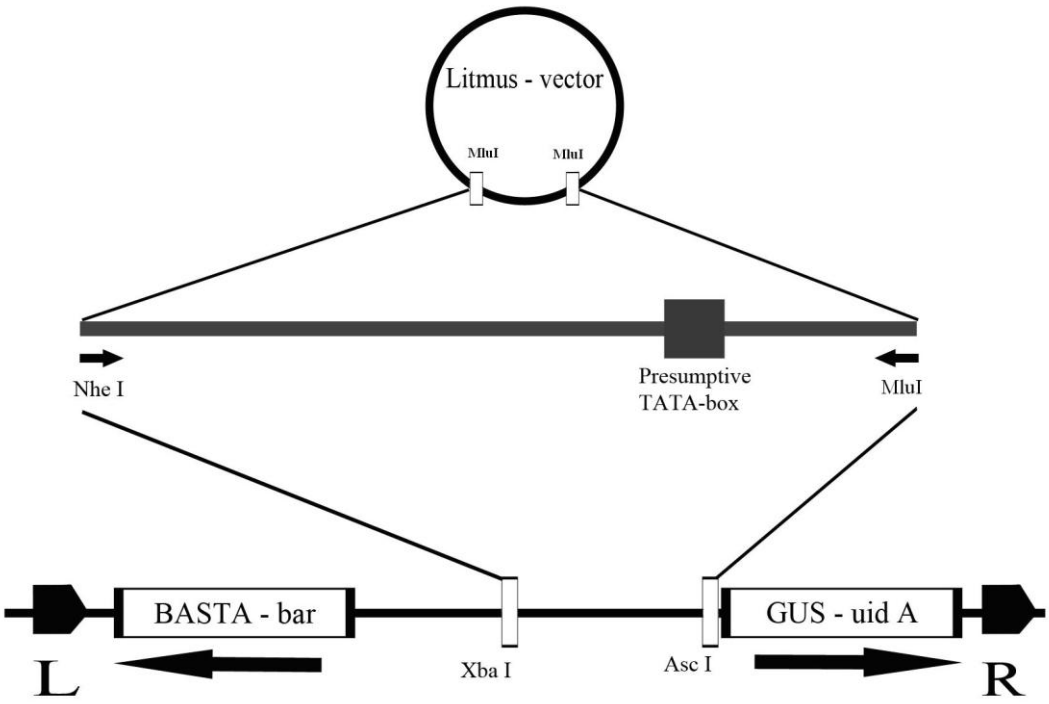


Рис. 1. Рекомбінантний конструкт Pro-APX2:GUS.

Fig. 1. Recombinant construct Pro-APX2:GUS.

Липкі кінці, що утворюються в результаті розщеплення ДНК цими рестриктазами комплементарні до таких, що утворюються в результаті дії рестриктаз *Xba* I та *Asc* I, які наявні у полілінкерному сайті бінарного вектора.

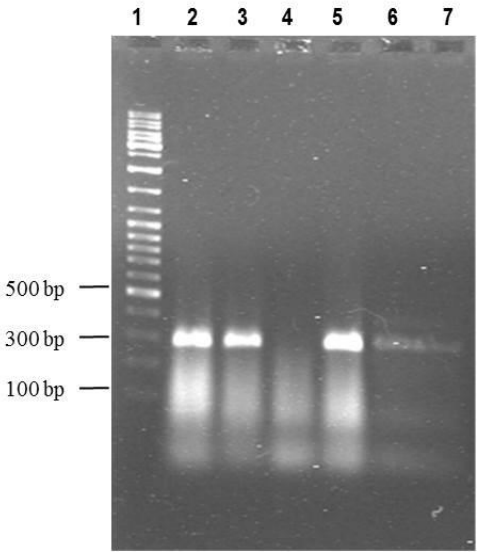
Як матрицю для ПЛР було використано клон pApx2_A-01. Отриманий ПЛР продукт було розщеплено відповідними рестриктазами та ліговано у бінарний вектор pGPTV-BAR (Becker et al., 1992). Цей бінарний вектор біля правої границі Т-ДНК містить репортерний ген глюкоронідази (*uidA*), а біля лівої границі Т-ДНК – селективний маркер – ген стійкості до гербіциду BASTA, який використовується для скринінгу трансформованих рослин.

Переклонування промоторної ділянки *Apx2* у бінарний вектор проводили між цими генами. Крім того, вектор pGPTV-BAR несе ген, який забезпечує стійкість до антибіотику канаміцину. Після трансформації у агробактерії на селективному середовищі, яке містило антибіотики канаміцин, гентаміцин та рифампіцин було відібрано 6 колоній, з яких було виділено ДНК. Методом ПЛР була показана присутність інсерції (рис. 2), яка являє собою послідовність промотора *Apx2*. Для подальшої трансформації у рослини була відібрана колонія pApx2_A-01-1.

Для проведення трасформації рослин клітини дводенної культури *Agrobacterium tumifaciens* лінії GV3101, що містили рекомбінантний конструкт, інкубували протягом 2 днів при температурі 28ºС. Середовище для інкубування містило 10 г пептону; 5г дріжджового екстракту; 10г NaCl та антибіотики канаміцин 50 мг/мл, гентаміцин 40 мг/мл, рифампіцин 50 мг/мл. Клітини осаджували центрифугуванням при 4 тис.об/хв. протягом 10 хв. та вносили в інфільтраційне середовище такого складу: 0.5 Х поживне середовище Мурасіге-Скуга; вітамін В5 112 мг/л; 5% сахароза; 0.005% Silwet Gold; 0,44 мкМ БАП. Концентрацію клітин в інфільтраційному середовищі визначали за оптичною густиною клітин при довжині хвилі 590 нм. Необхідна оптична густина поглинання становила 0,9. Цією агробактеріальною культурою трансформували гаметофіти.

З рослин, гаметофіти яких було трансформовано, збирали насіння та висаджували його у грунт. Для зручності проведення маніпуляцій для висадки насіння використовували ємність з низькими бортами та великою площею. Десяти- та 14- денні проростки обприскували гербіцидом BASTA. В результаті такої обробки було виявлено 7 резистентних рослин, що представляють собою перше покоління рослин-трансформантів (Т1).

Для підтвердження того, що рослини дійсно містять бажаний рекомбінантний конструкт, з кожної індивідуальної рослини була виділена ДНК, яка слугувала матрицею для ПЛР. При цьому було використано праймери, комплементарні до гену *uidA*.



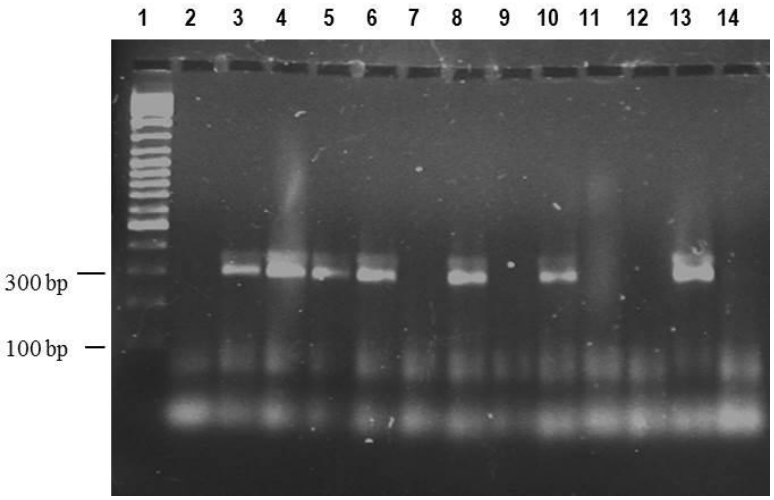


Рис. 2. Скринінг колоній Agrobacterium tumifaciens, трансформованих рекомбінантним конструктом Pro-APX2:GUS.

Примітка: 1 – маркер молекулярних мас GeneRuler Smo331; 2-7 – ПЛР-ампліфікати промотору гену Apx2, отримані з використанням в якості матриці ДНК агробактерій.

Рис. 3. Скринінг рослин Arabidopsis thaliana, трансформованих рекомбінантним конструктом Pro-APX2:GUS.

Примітка: 1 – маркер молекулярних мас GeneRuler Smo331; 2-14 – ПЛР-ампліфікати репортерного гену uidA (GUS), отримані з використанням в якості матриці ДНК рослин T1.

Fig. 2. Screening of colonies of Agrobacterium tumifaciens, transformed with a recombinant construct Pro-APX2: GUS.

Note: 1 – molecular weight marker GeneRuler Smo331; 2-7 – PCR amplification products of Apx2 gene promoter, when agrobacteria DNA was used as a matrix.

Fig. 3. Screening of plant Arabidopsis thaliana, transformed with a recombinant construct Pro-APX2: GUS

Note: 1 – molecular weight marker GeneRuler Smo331; 2-14 – PCR amplification products of uidA (GUS) reporter gene, when T1 plant DNA was used as a matrix.

Такий дизайн праймерів забезпечував утворення ПЛР-продукту тільки в тому випадку, якщо рослина дійсно містила рекомбінантний конструкт. Аналіз продуктів ПЛР після електрофоретичного розподілу дозволив нам ідентифікувати 7 ліній рослин: ProAPX2-3, ProAPX2-4, ProAPX2-5, ProAPX2-6, ProAPX2-8, ProAPX2-10, ProAPX2-13 (рис. 3), що містили конструкт Pro-APX2:GUS, у складі якого присутній *Apx2* промотор та ген *uidA.*

Висновки. Для дослідження стрес-індукованої експресії гену *Apx2* у різних органах та тканинах арабідопсису було створено рекомбінантний конструкт, який складається з повнорозмірного промотора *Apx2* (Pro-Apx2) та гену β-глюкоронідази (GUS). Після проведення трансформації гаметофітів *A. thaliana* клітинами *Agrobacterium tumifaciens* лінії GV3101 отримано лінії рослин T1, сім з яких несли рекомбінантний конструкт Pro-APX2:GUS.

Список літератури:

1. Arondel V., Vergnolle C., Canterl C., Kader J.-C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. – 2000. – Vol.157, № 1.- P. 1-12.
2. Bechtold N., Ellid J., Pelletier G. In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants // C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci. – 1993. – Vol. 316. – P.1194-1199.
3. Becker D., Kemper E., Schell J., Masterson R. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border // Plant Mol. Biol. – 1992. – Vol. 20. – P.1196-1197.
4. Chang C., Chen C., Ball L., Fryer M.J., Baker N.R., Karpinski S., Mullineaux P.M. Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is assiciated with changes in photosynthesis // The Plant J. – 2004. – Vol. 38. – P.499-511.
5. Chen X., Wang M.L., Holbrook C. Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut // Plant. Mol. Biol. Rep. – 2011. – Vol. 29, №2. – P.389-403.
6. Dabrowska G., Kata A., Goc A., Szechynska-Hebda M., Skrzyptek E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family // Acta Biologica Cracoviensia. – 2007. – Vol. 49. – P. 7-17.
7. Galvez-Valdivieso G., Fryer M.J., Lawson T., Slattery W., Truman W., Smimof N., Asami T., Davies W.J., Jones A.M., Baker N.R., Mullinaux P.M. The high light response in Arabidopsis involves

ABA signalling between vascular and bundle sheath cells // The Plan Cell. – 2009. – Vol. 21. – P.2143-2162.
8. Grégoire C., Rémus-Borel W., Vivancos J., Labbé C., Belzile F., Bélanger R.R. Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *Equisetum arvense* // Plant J. – 2012. – Vol. 72, № 2. – P. 320–330.
9. Karpinski S., Escobar C., Karspinska B., Creissen G., Mullineaux P.M. Photosynthetic electron regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis thaliana excess light stress // The Plant Cell. – 1997. – Vol. 9. – P.627-640.
10. Li Y., Darley C.P., Ongaro V., Fleming A., Schipper O., Baldauf S.L., McQueen-Mason S.J. Plant expansis are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 128. – P.854-864.
11. Mittler R., Kim Y.S., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., Zhu J. Gain- and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress // FEBS Letters. – 2006. - № 580. – P. 6537-6542.
12. Panchuk I., Volkov R., Schöffl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129**,** № 6. – P. 838-853.
13. Rossel J.B., Walter P.B., Hendickson L., Chow W.S., Poole A., Mullineaux P.M., Pogson D.J. A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance // Plant Cell. – 2006. – Vol. 29. – P.269-281.
14. Shigeoka S., Ishikava T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53. – P.1305-1319.
15. Suzuki N., Miller H., Sejima H., Harper J., Mittler R. Enhanced seed production under prolonged heat stress condition in Arabidopsis thaliana plantas deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2 // J. Exp. Bot. – 2012. – P. 1-11.

OBTAINING TRANSGENIC PLANTS BEARING REPORTER GENE UNDER CONTROL OF APX2 PROMOTER

T. O. Rusnak, I. I. Panchuk

Ascorbate peroxidase (APX) represents an enzyme involved in plant cell protection against oxidative stress. In Arabidopsis thaliana, APX is encoded by a small multigenic family comprising 8 genes. The 8 isoforms of APX present in chloroplasts, peroxisomes and cytosol are differentially activated in response to abiotic stress. Especially, Apx2 is a typical stress-inducible gene, which is transcriptionally active only upon stressful conditions. In order to elucidate stress-dependent expression of Apx2 in different organs and tissues of A. thaliana promoter region of the gene was amplified by PCR and cloned. The promoter was fused with uidA reporter gene coding for β-glucuronidase and introduced into A. thaliana wild type plants applying Agrobacterium-mediated transformation. Transgenic plants were identified using treatment with herbicide BASTA. Presence of the recombinant construct in plants was confirmed by PCR. In total, 7 independent lineages bearing Pro-APX2:GUS fusion construct were isolated.

Key words: Apx2 promoter, binary vector, transgenic plants, BASTA, reporter gene.

Одержано редколегією 08.09.2014