

## ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 577.21:582.926.2

### LOX-ОПОСЕРЕДКОВАНА ЕКСПРЕСІЯ GUS ГЕНА В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ТЮТЮНУ

© 2015 р. Н. Л. Щербак, М. В. Кучук

*Інститут клітинної біології і генетичної інженерії*

*Національної академії наук України*

*(Київ, Україна)*

У попередніх дослідженнях була показана можливість *lox*-опосередкованої експресії *bar* гена в трансгенних рослинах, що відбувалася при використанні векторів, які містили послідовність *lox*-сайту замість промотора *bar* гена біля правого бордера (RB-*lox-bar*). В цій роботі досліджено *lox*-опосередковану експресію репортерного гена *gus* з використанням векторів аналогічної будови: безпромоторний *gus* ген з *lox*-сайтом біля правого бордера (RB-*lox-gus*). Створені вектори показали активність  $\beta$ -глюкуронідази при транз'єнтній експресії *gus* гена в листках *Nicotiana benthamiana*, інфільтрованих за допомогою *Agrobacterium*. Запропонована *lox*-опосередкована система експресії також була досліджена при вивченні активності *gus* гена в стабільно трансформованих рослинах тютюну. Крім того, в цих експериментах було показано вплив енансера 35S промотора на *lox*-опосередковану експресію *gus* гена. За відсутності 35S промотора активність *gus* гена спостерігалась у 1,5% трансгенних рослин, а рівень експресії був низьким. За наявності послідовності 35S промотора у тій самій Т-ДНК, частота трансгенних рослин, які виявили GUS активність, зростала до 10%, а рівень експресії збільшувався у три рази.

**Ключові слова:** *lox сайт, експресія трансгенів, 35S промотор*

Основним напрямом генетичної інженерії залишається удосконалення властивостей культурних рослин. Генно-інженерні підходи в кінцевому підсумку спрямовані на підвищення урожайності, поживних та харчових якостей, стійкості рослин до хвороб та абіотичних стресорів. У багатьох випадках бажана ознака трансгенної рослини залежить від взаємодії між кількома білками. Таким чином виникає потреба використання полігенних конструкцій та відповідно збільшується кількість регуляторних елементів, що використовуються у векторах для трансформації (Lessard et al., 2002; Naqvi et al., 2010). При створенні полігенних конструкцій дублювання промоторів є небажаним, оскільки повтори послідовностей ДНК у геномі трансгенної рослини призводять до «замовчування» генів (Selker et al., 1999; Muskens et al., 2000; Matzke et al., 2000; 2002). Одним з підходів для вирішення цих проблем може бути ви-

користання регуляторних послідовностей, що мають незначний ступінь гомології з традиційними промоторами. Крім того, такі послідовності можуть бути використані, як модулі при створенні штучних промоторів. Цей факт зумовлює незгасаючий інтерес дослідників до нових промоторів, які можна було б використовувати у векторах для трансформації рослин.

Починаючи з перших векторів для генетичної трансформації рослин, в яких були використані промотори генів ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (Herrera-Estella et al., 1983), іде постійний пошук регуляторних послідовностей, які б могли забезпечити високий рівень контрольованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. Було клоновано і охарактеризовано велику кількість вірусних та рослинних промоторів, а також виділені основні регуляторні модулі цих послідовностей (Potenza, 2004). Методом Т-ДНК тагетінгу в геномі рослин також були виявлені криптичні промоторні послідовності (Fobert et al., 1994; Foster et al., 1999), які надалі були використані у векторах для трансформації рослин (Plesch et al.,

*Адреса для кореспонденції:* Щербак Наталія Леонідівна, Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, вул. Заболотного 148, Київ 03680, Україна; e-mail: natasha@icbge.org.ua

## LOX-ОПОСЕРЕДКОВАНА ЕКСПРЕСІЯ GUS ГЕНА

2000; Wu et al., 2001; 2003). Такі послідовності не впливають на експресію генів, а їх регуляторний потенціал виявляється лише в певному генетичному оточенні. В нашій роботі ми також зіткнулись з ситуацією, коли експресія гена відбувалась під впливом послідовності, що не вважається регуляторною, а експресія гена проходить лише при певному розміщенні цієї послідовності у плазмідному векторі. На відміну від криптичних промоторів, ця послідовність не є геномною ДНК рослин. У трансгенних рослинах тютюну експресія безпромоторного *bar* гена відбувалась під впливом *lox*-сайту бактеріофагу P1, розташованого в генетичних конструкціях безпосередньо біля правого бордера T-ДНК (RB-*lox-bar*-) (Щербак та ін., 2006). Про наявність експресії свідчила стійкість трансгенних рослин до гербіциду фосфінотрицину, а також наявність відповідної мРНК в тотальній РНК рослин. При розміщенні послідовності -*lox-bar*- в середині вектора експресії гена *bar* та відповідно виникнення стійкості до гербіциду у трансгенних рослин не відбувалося (Shcherbak et al., 2013). При використанні векторів, що забезпечують *lox*-опосередковану експресію *bar* гена, були отримані стійкі до гербіциду фосфінотрицину трансгенні рослини рапсу (Сахно та ін., 2008), цукрового буряку, картоплі та салату (Shcherbak et al., 2013). Було підтверджено високу частоту виникнення стійких до гербіциду трансгенних рослин цих видів та стабільність експресії *bar* гена, а також стійкість до гербіциду як в умовах *in vitro*, так і в умовах теплиці.

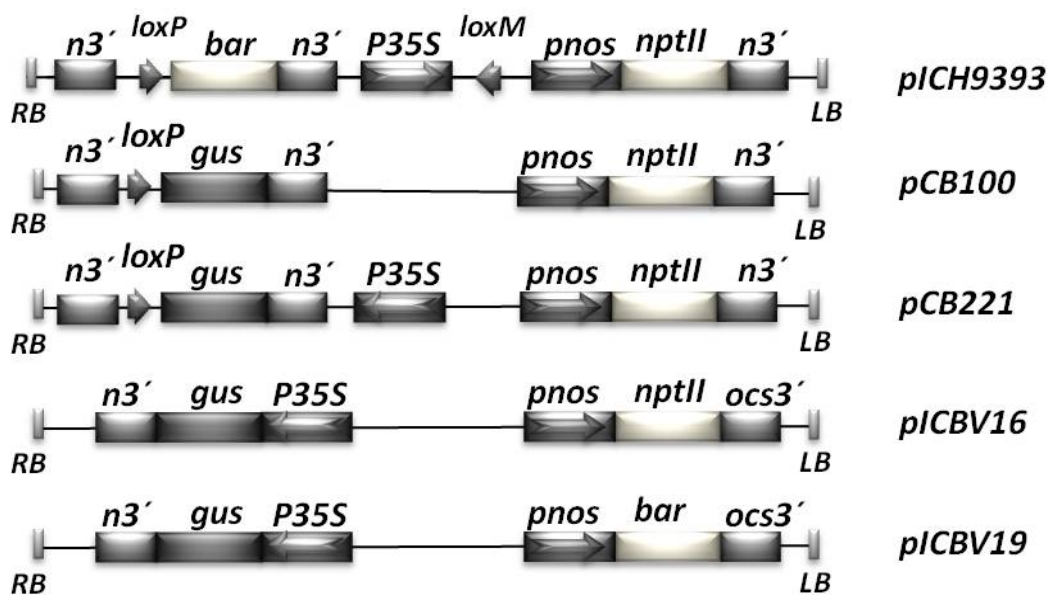
Метою наших подальших досліджень було перевірити можливість використання таких векторів для експресії інших генів в трансгенних рослинах. У цій роботі ми досліджували *lox*-опосередковану експресію репортерного гена *gus*, використовуючи вектори, що мають аналогічну будову: безпромоторний *gus* ген з *lox*-сайтом біля правого бордера (RB-*lox-gus*). Як відомо, ген *gus* кодує фермент  $\beta$ -глюкуронідазу і є зручним маркерним геном, що широко застосовується у векторах для генетичної трансформації рослин (Jefferson et al., 1987). Саме цей ген найчастіше використовують для оцінки ефективності та специфічності нових промоторних послідовностей (Omirulleh et al., 1993), оскільки, з одного боку, він дозволяє завдяки простій гістохімічній реакції оцінити наявність експресії трансгена в тканинах рослини, а з іншого, використовуючи метод спектрофлуориметрії, провести кількісну оцінку ефективності експресії (Guivarc'h et al., 1996).

У роботі була проведена оцінка *lox*-опосередкованої експресії гена *gus* при транзиторній експресії в листках рослин *Nicotiana benthamiana*, інфільтрованих за допомогою *Agrobacterium*. Були отримані трансгенні рослини тютюну та досліджена активність *gus* гена в стабільно трансформованих рослинах. Також в цих експериментах було вивчено вплив енхансера 35S промотора на *lox*-опосередковану експресію *gus* гена.

## МЕТОДИКА

**Векторні конструкції та бактеріальні штами.** У роботі були використані вектори: pICH9393, pICBV19, pICBV16, pCB100 та pCB221 (рис. 1). Генетичні конструкції pICH9393, pICBV19, pICBV16 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН).

Для створення генетичної конструкції pCB100 використовували вихідний бінарний вектор для агробактеріальної трансформації pICH9393, що містить *bar* ген без промотора, а також *lox* сайт та *nos* термінатор біля правого бордера. Послідовність, що включає *bar* ген, незалежний 35S промотор та *lox* сайт в середині вектора була видалена за допомогою рестриктаз *SacI* та *PstI*. За допомогою тих же рестриктаз послідовність *gus* гена (а саме безпосередньо кодуюча ділянка гена без промотора, але з кінцевим термінатором) була вирізана з вектора pICBV19. Видалення фрагментів із агарозного гелю проводили за допомогою набору для екстракції ДНК (DNA Extraction Kit «Fermentas»). Використання одних й тих самих рестриктаз при вирізанні фрагмента та розщепленні вектора дало змогу провести лігування необхідних фрагментів без додаткових маніпуляцій. Лігування проводили за допомогою ДНК лігازی «Fermentas», згідно з рекомендаціями, наведеними у супровідних документах. У результаті був отриманий вектор pCB100, що містить кодуючу послідовність *gus* гена без промотора, а також *lox* сайт та *nos* термінатор біля правого бордера (рис. 1). На основі вектора pCB100 був створений вектор pCB221, в який було додано послідовність енхансера 35S промотора в середині вектора безвідносно до послідовності будь-якого з генів. Послідовність 35S промотора була вирізана з вектора pICBV16. Плазміда була «розлініена» рестриктазою *EcoRI*, а виступаючий 3' кінець видалений (утворений «тупий» кінець) за допомогою фрагмента Кльонова (Klenow Fragment «Fermentas»). Потім вставка була вирізана рестриктазою *NcoI*. Підготовка вектора pCB100 проходила у три



**Рис. 1.** Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів.

P35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; pnos – промотор гена нопалін синтази; n3' – термінатор гена нопалін синтази; ocs3' термінатор гена октопін синтази; *loxP* – послідовність сайту рекомбінації бактеріофагу P1; *bar* – ген фосфінотрицинацетилтрансферази; *nptII* – ген неоміцин-фосфотрансферази II; *gus* – ген  $\beta$ -глюкуронідази.

етапи: рестрикція *PstI*, обробка фрагментом Кльонова, рестрикція *NcoI*.

Трансформацію *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101 бінарними векторами pCB100 та pCB221 проводили методом електропорації, відповідно до рекомендацій, запропонованих у супровідних документах до приладу MicroPulser Electroporator (BioRad). Для трансформації рослин використовували нічну культуру агробактерії, вирощену в рідкому середовищі LB при 24°C на ротаційному шейкері (200 об./хв).

**Рослинний матеріал.** Використовували асептичні рослини тютюну *Nicotiana tabacum* сорту Wisconsin, що культивувалися в умовах *in vitro*, а також рослини *Nicotiana benthamiana*, що вирощувалися в умовах теплиці.

**Генетична трансформація тютюну за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*.** Генетичну трансформацію тютюну проводили методом спільного культивування листкових дисків та розведеної у 2-3 рази нічної агробактеріальної культури. Для цього нічну бактеріальну культуру осаджували при 6 об./хв., 4°C протягом 10 хв. та ресуспендовали у відповідному об'ємі рідкого середовища MS. Середовище для спільного культивування містило також ацетосерингон у концентрації 0,2 мМ. Після спільного культивування експланти переносили на регенераційне середовище MSR – MS (Murashige, Skoog, 1962) з додаванням 1 мг/л БАП та

0,1 мг/л НОК, яке містило також 100 мг/л канаміцину для селекції та 800 мг/л цефотаксиму для елімінації бактерій.

**Аналіз трансформованих рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).** Для доведення наявності трансгенів у трансформованих рослинах аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану ЦТАБ-методом (Doyle, Doyle, 1990). Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували плазмідну ДНК векторів. Реакцію ампліфікації проводили з використанням праймерів, специфічних до гена *gus* та *nptII* (таблиця). Реакційна суміш містила 100 нг сумарної рослинної ДНК, сольовий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,01 % Тритон X-100), по 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, по 0,2 мкМ кожного з праймерів та 1 одиницю Taq-полімерази. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл.

**Гістохімічний аналіз активності  $\beta$ -глюкуронідази.** Аналіз експресії гена  $\beta$ -глюкуронідази згідно з Jefferson et al. (1987), проводили в 100 мМ фосфатному буфері pH 7,0, який містив 1 мМ X-Gluc, 10 мМ ЕДТА, 0,1% Тритон X-100, 2,5 мМ K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2,5 мМ K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2 мМ дитіотрейтолу, 0,1% ДМСО, при 37°C протягом доби. Після проходження ферментативної реакції, хлорофіл з тканин видаляли інкубуючи експланти у 70% етанолі від 3 до 10 діб.

## ЛОХ-ОПОСЕРЕДКОВАНА ЕКСПРЕСІЯ GUS ГЕНА

### Праймери, які були використані в роботі, для проведення ПЛР

Ген	Послідовність праймерів	Температура реасоціації	Продукт ампліфікації
<i>gus</i>	5'-TGGGTGGACGATATCACCGTGGTGA-3'; 5'-GGCCCAATCCAGTCCATTAATGCG-3'	56°C	432 п. н.
<i>npt II</i>	5'-CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA-3' 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3'	62°C	622 п. н.

**Кількісне визначення вмісту білка GUS** в листках трансгенних рослин оцінювали за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції сполуки 4-MU (4-Methylumbelliferone), що утворюється при розщепленні 4-MUG (4-Methylumbelliferyl-b-D-glucuronide) ферментом  $\beta$ -глюкуронідазою (Jefferson et al., 1987). Вимірювання флуоресценції проводили в кюветах об'ємом 3 мл на спектрофлуориметрі PerkinElmer LS 55, використовуючи довжину хвилі збудження 365 нм та емісії 455 нм. Кількість білка  $\beta$ -глюкуронідази оцінювали за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції речовини 4-MU та співвідносили її із загальною кількістю білка в кожній пробі, що визначалася за методом Бредфорд (Bradford, 1976).

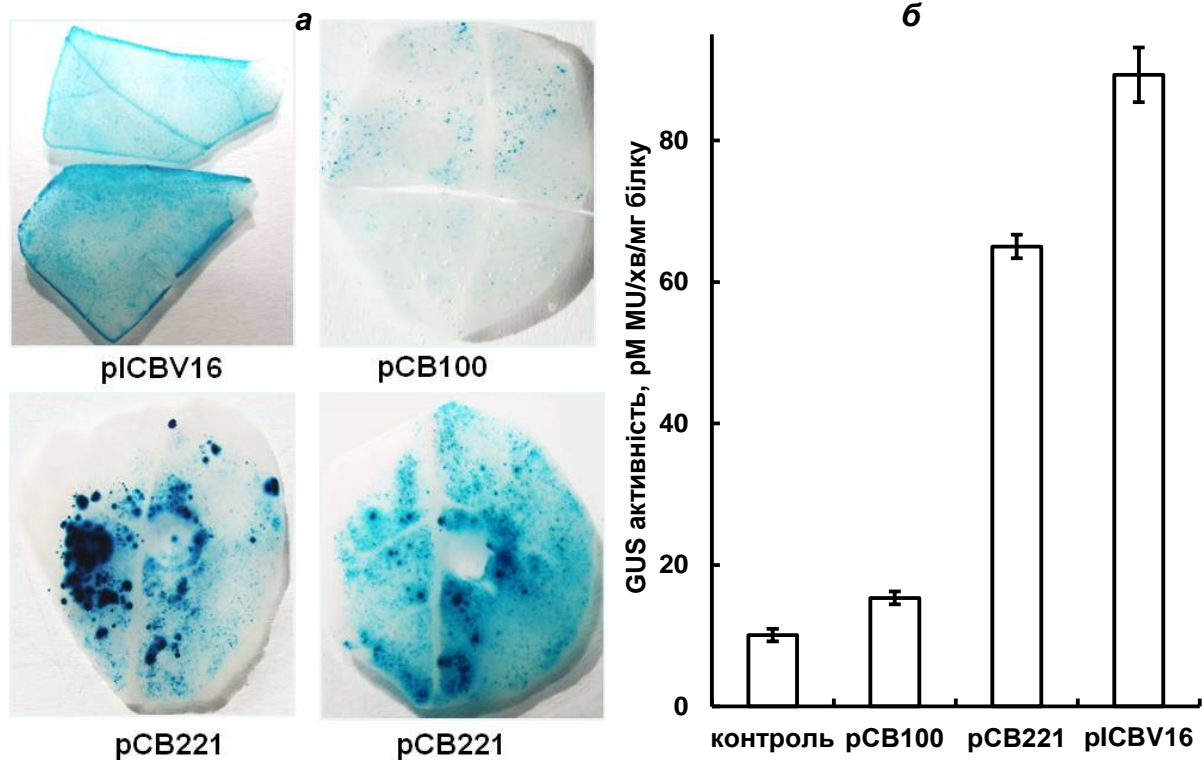
**Транзйентна експресія *gus* гена в рослинах *N. benthamiana*.** Для проведення експериментів з транзйентної експресії були використані рослини *N. benthamiana*, що вирощувались в умовах теплиці. Найбільш ефективною транзйентна експресія була в рослинах, що характеризуються швидким приростом біомаси, до початку цвітіння рослин. В наших умовах це були рослини *N. benthamiana*, вирощені з насіння, віком приблизно 3-4 тижні. Листки рослини були інфільтровані бактеріальною суспензією, що містила один з дослідних векторів та вектор рICN6692, який містить ген білку Р19 вірусу кущистої карликовості томатів. Цей білок є супресором пост-транскрипційного та індукованого вірусами сайлесінгу генів в рослинах (Qiu, 2001) і використовується в інфільтраційній суспензії для запобігання «замовчування генів». Нічну бактеріальну культуру осаджували та ресуспендували у буфері, який містив 10 мМ MES (рН 5,5) та 10 мМ MgSO<sub>4</sub>. Для інфільтрації використовували суспензію, яку розводили у 4-5 разів (OD<sub>600</sub> 0,6-0,8).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

**Транзйентна *lox*-опосередкована експресія *gus* гена.** На першому етапі нашої роботи визначали активність *gus* гена, при використанні векторів рCB100 та рCB221 під час транзйентної експресії. Для цього проводили інфільтрацію листків *N. benthamiana* агробактеріальною

суспензією, до складу якої входила агробактерія з одним з трьох векторів, що містив *gus* ген (рICBV16, рCB100 та рCB221), а також вектор рCB6692, який містить ген білка Р19, що є супресором сайлесінгу. Вектор рICBV16 був використаний як позитивний контроль, він містить *gus* ген під контролем 35S промотора. Вектор рICN9393, що не містить *gus* гена, був використаний як негативний контроль (рис. 1). Детекцію експресії гена *gus* проводили на четвертий день після інфільтрації. Для цього вирізували зони інфільтрації з листків *N. benthamiana*, проводили гістохімічний аналіз та візуальне порівняння інтенсивності синього забарвлення у кожному з варіантів.

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок, що навіть при візуальному порівнянні інтенсивності синього забарвлення спостерігається відмінність між векторами рCB100, рICBV16 та рCB221 при транзйентній експресії (рис. 2-а). У порівнянні з контролем, вектором рICBV16, в якому *gus* ген перебуває під контролем 35S промотора, транзйентна *lox*-опосередкована експресія *gus* гена при використанні вектора рCB100 була досить слабкою. Але у векторі рCB221, який на відміну від вектора рCB100, містить в середині енхансерну послідовність 35S промотора, спостерігалось значне збільшення експресії *gus* гена. Для кількісної оцінки GUS активності за допомогою флуориметричного методу проводили виділення тотального білка з інфільтрованих листків рослин *N. benthamiana* та вимірювали концентрацію білка у розчині за методом Бредфорд (Bradford, 1976). Кількість білка  $\beta$ -глюкуронідази оцінювали за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції речовини 4-MU, що утворюється під час ферментативної реакції, та співвідносили її із загальною кількістю білку в кожній пробі. Отримані результати представлені на рис. 2, б. В цілому, можна констатувати, що результати кількісного аналізу GUS активності, визначеної за допомогою флуориметричного методу, збігаються з результатами гістохімічного аналізу активності  $\beta$ -глюкуронідази для кожного з векторів. GUS активність під час транзйентної експресії при ін-



**Рис. 2.** Результати аналізу GUS активності при транзійтній *lox*-опосередкованій експресії *gus* гена.

*а* – результати гістохімічного аналізу демонструють збільшення синього забарвлення для вектора pCB221 порівняно з вектором pCB100;

*б* – кількісна оцінка вмісту білку GUS в листках *N. benthamiana* після інфільтрації векторами, що містять *gus* ген, визначена методом флуориметричного аналізу; вектор pICBV16 – *gus* ген під контролем 35S промотора, вектори pCB100 та pCB221 містять послідовність RB-*lox*-*gus*, контроль – вектор pICN9393 – не містить гена *gus*.

Представлені дані відображають середні значення трьох незалежних вимірювань та середню квадратичну похибку.

фільтрації листків вектором pCB100 є більшою від негативного контролю (вектор pICN9393), та значно збільшується при використанні вектора pCB221.

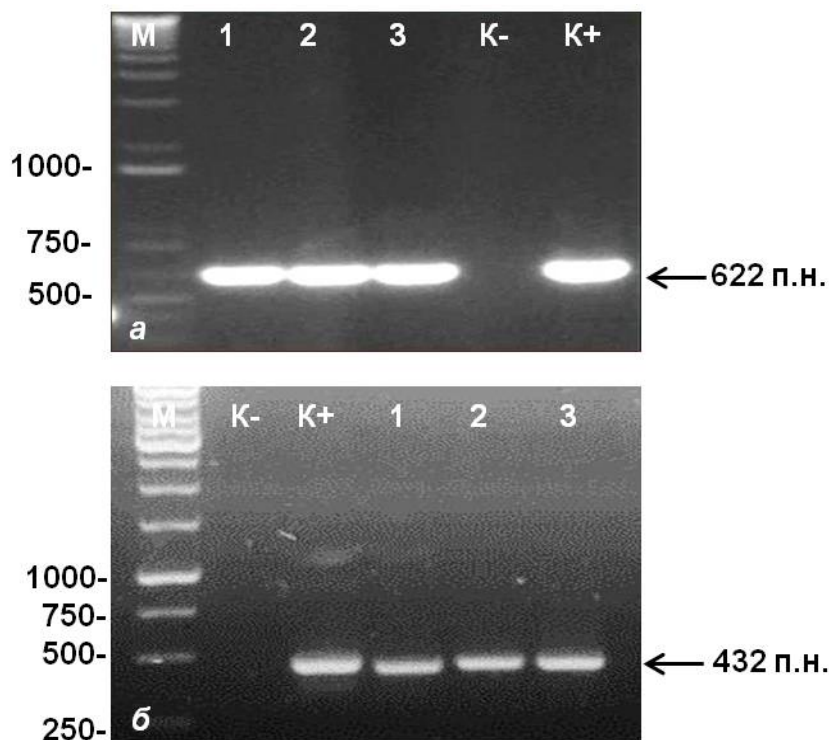
***Lox*-опосередкована експресія *gus* гена в стабільно трансформованих рослинах тютюну.** Після проведення трансформації рослин тютюну векторами pCB100, pICBV16 та pCB221, селекція рослин проводилась на канаміцині, оскільки всі три вектори містили селективний ген *nptII*. Гістохімічний аналіз експресії  $\beta$ -глюкуронідази показав, що первинний калус, який утворювався у зрізах експлантів тютюну на селективному середовищі, що містило 100 мг/л канаміцину, мав активність  $\beta$ -глюкуронідази в усіх трьох варіантах трансформації. Але при цьому слід зазначити, що інтенсивність забарвлення та частота виникнення GUS позитивних ліній для вектора pICBV16 була більшою. Надалі, на стадії регенерації рослин, у трансгенних ліній після трансформації

вектором pCB100, ми спостерігали зменшення інтенсивності забарвлення та кількості трансгенних ліній, що мали голубе забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу активності  $\beta$ -глюкуронідази. Менш вираженим зменшення інтенсивності експресії гена *gus* та відповідно активності  $\beta$ -глюкуронідази було для трансгенних ліній після трансформації вектором pCB221.

Рослини, які після трансформації вкорінювались на селективному середовищі, що містило 100 мг/л канаміцину, були перевірені за допомогою ПЛР та відповідних праймерів (таблиця) на наявність генів *gus* та *nptII* у геномі цих рослин. У результаті проведеної ПЛР та подальшого електрофорезу було підтверджено синтез фрагментів очікуваного розміру: 622 п.н. для *nptII* гена (рис. 3, *а*) та 432 п.н. для *gus* гена (рис. 3, *б*).

Більшість відібраних трансгенних рослин, трансформованих вектором pCB100, згід-

### LOX-ОПОСЕРЕДКОВАНА ЕКСПРЕСІЯ GUS ГЕНА



**Рис. 3.** Електрофореграма результатів аналізу за допомогою ПЛР тотальної ДНК рослин тютюну, отриманих після трансформації вектором рСВ221, з використанням праймерів до *nptII* (а) та *gus* (б) генів.

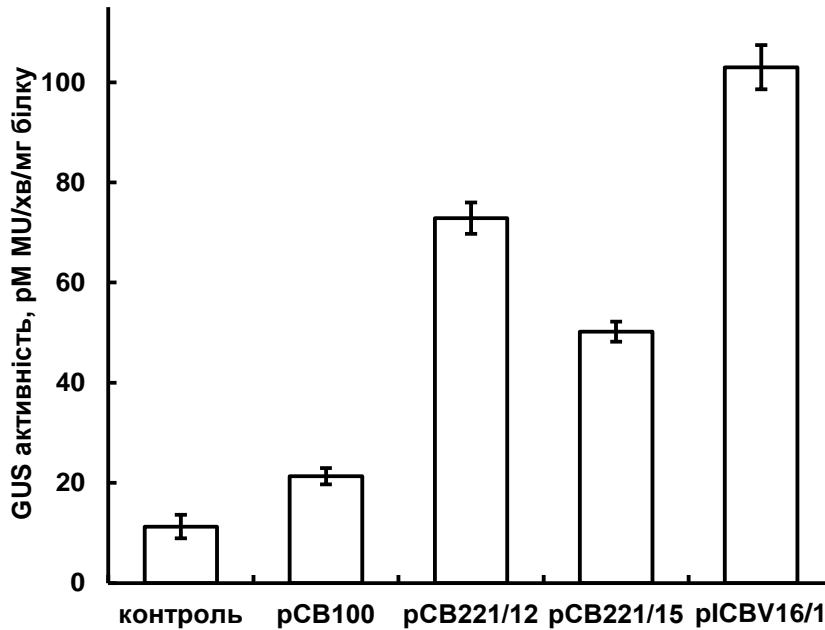
М – маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); К+ – позитивний контроль ДНК плазмиди рСВ221; К – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини тютюну; 1-3 – ДНК рослин-регенерантів тютюну, стійких до канаміцину, з праймерами до *nptII* (а) та *gus* (б) генів.

но з результатами гістохімічного аналізу, не мали  $\beta$ -глюкуронідазної активності. Приблизно 8% регенерантів мали голубе забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу на стадії формування проростків і до вкорінення рослин. І лише кілька трансгенних ліній зберегли GUS активність після вкорінення та формування рослини в умовах *in vitro*. Було проаналізовано приблизно дві сотні регенерантів рСВ100, що вирости на селективному середовищі, серед яких лише три лінії зберегли невисокий рівень активності  $\beta$ -глюкуронідази (1,5% трансформантів).

Після трансформації рослин тютюну вектором рСВ221 частота виникнення рослин, які мали голубе забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу, була на порядок вищою ніж для вектора рСВ100, і складала приблизно 10%. Інтенсивність голубого забарвлення GUS позитивних ліній рСВ221 також була більшою ніж для GUS позитивних ліній рСВ100, хоча і меншою ніж для контрольного вектора рICBV16, що підтверджувалося також і даними флуориметричного аналізу. Результати флуориметричного аналізу представлені на рис. 4. Отримані дані переконливо демонструють вплив енхан-

сера 35S промотора на *lox*-опосередковану експресію *gus* гена. За наявності послідовності 35S промотора у тій самій Т-ДНК, ми спостерігали суттєве збільшення як кількості трансгенних рослин, що виявляли GUS активність, так і рівня експресії *gus* гена у GUS позитивних трансгенних рослинах.

Проведені дослідження чітко демонструють можливість *lox* опосередкованої експресії *gus* гена, як при транзійтній експресії, так і в трансгенних рослинах. Крім того, ми визначили додаткові умови, за яких відбувається *lox* опосередкована експресія. Наявність 35S промотора у векторі значно збільшує активність *gus* гена, що, на наш погляд, є підтвердженням впливу енхансера 35S промотора на *lox* опосередковану експресію. З опублікованих даних відомо, що енхансер 35S промотора впливає на інші промотори у векторі для трансформації, збільшуючи їх активність та нівелюючи специфічність тканинспецифічних та органоспецифічних промоторів (Zheng et al., 2007). У попередній публікації ми наводили дані аналізу *in situ* послідовності RB-*lox* (Shcherbak et al., 2013). Проведений аналіз виявив послідовність СААТ боксу на ділянці RB та ТАТА бокс в межах по-



**Рис. 4.** Кількісна оцінка вмісту білку GUS в листках трансгенних рослин тютюну, проведена методом флуориметричного аналізу.

По осі X назви ліній трансгенних рослин, у яких активність *gus* гена була підтверджена за допомогою гістохімічного аналізу. Представлені дані відображають середнє значення, згідно з результатами трьох незалежних вимірювань в листках однієї рослини (висадженої в ґрунт) та середню квадратичну похибку середнього значення GUS активності.

```

          ATGCAAAATmotif
CTGTGGTTGG CATGCACATA CAAATGGACG AACGGATAAA CCTTTTCACG CCSTTTTAAA TATCCGATTA
          CAAAT box
TTCTAATAAA CGCTCTTTTC TCTTAGGTTT ACCCGCAAAT ATATCCTGTC AAACACTGAT AGTTTAAACT
          TGA-element CAAATbox ATCT-motif circadian
GAAGGCGGGA AACGACAATC TGATCATAAG CTTCATGCC TGCAGGTCGA CTCTAGAGGA TCCCCAACAT
          lox A site
CTAGAACAAC TTCGTATAGC ATACATTATA CGAAGT TATA GAGCTCTATT
  
```

**Рис. 5.** Послідовність RB-lox області.

Ймовірні регуляторні послідовності визначені програмою Plat CARE та PLACE database підкреслені, TATA бокс виділено жирним шрифтом, послідовність *lox* сайту підкреслено пунктиром.

слідовності *lox* сайту (рис. 5). Цілком логічним нам здається припущення, що *lox* сайт при розміщенні біля кодуєчої послідовності гена, завдяки наявності AT багатой послідовності може бути сайтом ініціації РНК-полімерази II та функціонувати як мінімальний промотор. Його «регуляторна активність» підсилюється завдяки СААТ боксу, а також енхансеру 35S промотора, що незалежно розміщений у векторі для трансформації.

## ЛІТЕРАТУРА

Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Стабільная експресия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях рапса // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, №1. – С. 21-28.

Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Гецько І.О., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Изучение влияния lox-сайтов Cre lox системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, №1. – С. 3-9.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.

Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – V. 12. – P. 13-15.

Fobert P.R., Labbe H., Cosmopolous J., Gottlob-McHugh S., Ouellet T., Hattori J., Iyer V.N., Miki B.L. T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco // Plant J. – 1994. – V. 6. – P. 567-577.

## ЛОХ-ОПОСЕРЕДКОВАНА ЕКСПРЕСІЯ GUS ГЕНА

- Foster P.R., Hattori J., Labbe H., Ouellet T., Fobert P.R., James L.E., Iyer V.N., Miki B.L. A tobacco cryptic constitutive promoter, *tCUP*, revealed by T-DNA tagging // *Plant Mol Biol.* – 1999. – V. 41. – P. 45-55.
- Guivarc'h A., Caissard J. C., Azmi A., Elmayan T., Chriqui D., Tepfer M. *In situ* detection of expression of the *gus* reporter gene in transgenic plants: ten years of blue gene // *Transgenic Res.* – 1996. – V. 5, № 5. – P. 281-288.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *EMBO J.* – 1987. – V. 20. – P. 3901-3907.
- Herrera-Estrella L., De Block M. D., Messens E., Herenalsteens J.P., Montagu M.V., Schell J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells // *EMBO J.* – 1983. – V. 2. – P. 987-995.
- Lessard P.A., Kulaveerasingam H., York G.M., Strong A., Sinskey A.J. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants // *Metab. Eng.* – 2002. – V. 4. – P. 67-79.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
- Naqvi S., Farre G., Sanahuja G., Capell T., Zhu C., Christou P. When more is better: multigene engineering in plants // *Trends Plant Sci.* – 2010. – V. 15. – P. 48-56.
- Matzke M.A., Mette M.F., Matzke A.J.M. Transgene silencing by the host genome defence: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 43. – P. 401-415.
- Matzke M.A., Aufsatz W., Kanno T., Mette M.F., Matzke A.J. Homology-dependent gene silencing and host defense in plants // *Adv. Genet.* – 2002. – V. 46. – P. 235-275.
- Muskens M.W.M., Vissers A.P.A., Mol J.N.M., Kooter J.M. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 43. – P. 243-260.
- Omirlulleh S., Abraham M., Golovkin M., Stefanov I., Karabaev M.K., Mustardy L., Mórocz S., Dudits D. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize // *Plant Mol. Biol.* – 1993. – V. 21. – P. 415-428.
- Plesch G., Kamann E., Mueller-Roeber B. Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell-specific gene expression // *Gene.* – 2000. – V. 16, № 1-2. – P. 83-89.
- Qiu W., Park J.W., Scholthof H.B. Tombusvirus P19-Mediated Suppression of Virus-Induced Gene Silencing Is Controlled by Genetic and Dosage Features That Influence Pathogenicity // *MPMI.* – 2002. – V. 15, № 3. – P. 269-280.
- Selker E.U. Gene silencing: repeats that count // *Cell.* – 1999. – V. 16, № 2. – P. 157-160.
- Shcherbak N., Kishchenko O., Sakhno L., Komarnitsky I., Kuchuk M. *Lox*-dependent gene expression in transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation // *Tsitol. Genet.* – 2013. – V. 47, № 3. – P. 21-32.
- Wu K., Malik K., Tian L., Hu M., Martin T., Foster E., Brown D., Miki B. Enhancers and core promoter elements are essential for the activity of a cryptic gene activation sequence from tobacco, *tCUP* // *Mol Genet. Genomics.* – 2001. – V. 265, № 5. – P. 763-770.
- Wu K., Hu M., Martin T., Wang C., Li X.Q., Tian L., Brown D., Miki B. The cryptic enhancer elements of the *tCUP* promoter // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 51. – P. 351-362.
- Zheng X, Deng W., Luo K., Duan H., Chen Y., McAvoy R., Song S., Pei Y., Li Y. The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters // *Plant Cell Rep.* – 2007. – V. 26. – P. 1195-1203.

Надійшла до редакції  
15.01.2015 р.

## LOX-DEPENDENT GUS GENE EXPRESSION IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS

N. L. Shcherbak, M. V. Kuchuk

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering  
National Academy of Sciences of Ukraine  
(Kyiv, Ukraine)  
e-mail: natasha@icbge.org.ua*

Previous work has shown the possibility *lox*-mediated expression of *bar* gene in transgenic plants provided by the vectors containing *lox* site instead of *bar* gene's promoter near RB (RB-*lox-bar*). In this paper we have analyzed reporter *gus* gene *lox*-mediated expression from the vectors that were similarly designed: promoterless *gus* gene together with the *lox* site adjacent to the RB (RB-*lox*-



*gus*). Constructed vectors were shown to provide  $\beta$ -glucuronidase activity in transient expression assays using an *Agrobacterium*-based leaf infiltration of *Nicotiana benthamiana*. Proposed *lox*-dependent expression system also was tested for activity of *gus* gene in transgenic tobacco plants. These experiments in addition showed the effect of independent 35S promoter sequence on *lox*-mediated expression of *gus* gene. In the absence of the 35S promoter sequence *gus* gene was active in 1.5% of transgenic plants and expression level was low. With the 35S promoter sequence in the same T-plasmid, the frequency of transgenic plants exhibited  $\beta$ -glucuronidase activity has increased to 10% and this vector could drive three fold higher level of *gus* gene expression.

**Key words:** *lox site, transgene expression, 35S promoter*

## **ЛОХ-ОПОСРЕДОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ GUS ГЕНА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА**

Н. Л. Щербак, Н. В. Кучук

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
Национальной академии наук Украины  
(Киев, Украина)  
e-mail: natasha@icbge.org.ua*

В предыдущих исследованиях была показана возможность *lox*-опосредованной экспрессии *bar* гена в трансгенных растениях, которая происходила при использовании векторов, содержащих последовательность *lox*-сайта вместо промотора *bar* гена возле правого бордера (RB-*lox-bar*). В этой работе мы исследовали *lox*-опосредованную экспрессию репортерного гена *gus*, используя векторы, которые имеют аналогичное строение: беспромоторный *gus* ген вместе с *lox*-сайтом возле правого бордера (RB-*lox-gus*). Созданные векторы показали активность  $\beta$ -глюкуронидазы при транзientной экспрессии *gus* гена в листьях *Nicotiana benthamiana*, инфицированных с помощью *Agrobacterium*. Предложенная *lox*-опосредованная система экспрессии также была изучена при экспрессии *gus* гена в стабильно трансформированных растениях табака. Также в этих экспериментах было показано влияние энхансера 35S промотора на *lox*-опосредованную экспрессию *gus* гена. В отсутствие 35S промотора активность *gus* гена была обнаружена у 1,5% трансгенных растений, а уровень экспрессии был низким. При наличии последовательности 35S промотора в той же Т-ДНК, частота трансгенных растений, проявлявших GUS активность, выросла до 10%, а уровень экспрессии увеличивался в три раза.

**Ключевые слова:** *lox сайт, экспрессия трансгенов, 35S промотор*