# - ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ <sub>–</sub> СТАТЬИ

УДК 581.1

# СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА pro-SmAMP1 ИЗ *STELLARIA MEDIA*

© 2016 г. Д. А. Высоцкий, С. Р. Стрельникова, Л. Н. Ефремова, Е. М. Ветчинкина, А. В. Бабаков, Р. А. Комахин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва Поступила в редакцию

В сорном растении звездчатка средняя (Stellaria media (L.) Vill.) была определена нуклеотидная последовательность фрагмента промоторной области гена антигрибных пептидов pro-SmAMP1 длиной 1257 п.н. Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности выявил ряд цис-элементов, характерных для сильных растительных промоторов. С учетом распределения цис-элементов было создано пять 5'-делеционных вариантов -1235, -771, -714, -603 и -481 п.н. промотора гена pro-SmAMP1, которые были слиты с кодирующей областью репортерного гена uidA в растительном экспрессионном векторе pCambia1381Z. Эффективность всех делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1 определяли методом транзиентной экспрессии в растениях Nicotiana benthamiana, а также с использованием последовательных поколений трансгенных растений Nicotiana tabacum. Установлено, что уровни активности репортерного белка GUS в экстрактах из трансгенных и агроинфильтрированных растений при использовании всех делеционных вариантов промотора гена pro-SmAMP1 были в 3-5 раз выше, чем при применении вирусного промотора 35S CaMV. В трансгенных растениях табака наибольшая активность белка GUS была отмечена в листьях и тесно коррелировала с уровнем мРНК кодирующего его гена. В 11 независимых гомозиготных линиях растений N. tabacum поколения T<sub>2</sub> с разными делеционными вариантами промотора pro-SmAMP1 уровни активности GUS существенно не отличались между собой. Полученные результаты дают основание предполагать, что все делеционные варианты промотора pro-SmAMP1 обеспечивают стабильный и высокий уровень экспрессии контролируемых генов. Самый короткий делеционный вариант -481 п.н. промотора pro-SmAMP1 целесообразно рассматривать как потенциально сильный растительный промотор для генетической инженерии растений.

Ключевые слова: *Stellaria media – Nicotiana benthamiana – Nicotiana tabacum –* pro-SmAMP1 – промотор – экспрессия GUS – транзиентная экспрессия – трансформация DOI: 10.7868/S0015330316050183

## введение

Прогресс, достигнутый в последние десятилетия в области развития технологий рекомбинантных ДНК, привел к разностороннему применению методов генетической инженерии во многих отраслях науки и производства. Одной из основных проблем в биотехнологии растений является регуляция транскрипции и точный контроль экспрессии рекомбинантных генов. Одним из наиболее важных инструментов для решения этой задачи являются промоторы. С функциональной точки зрения промоторы подразделяются на конститутивные, тканеспецифичные и индуцибельные.

В генетической инженерии растений наиболее широко применяется конститутивный промотор 35S CaMV, созданный на базе промоторной области гена белка оболочки вируса мозаики цветной капусты [1]. Благодаря широкому использованию в растительных векторах промотора 35S CaMV, исследователи, как правило, все новые промоторы по своей эффективности сопоставляют именно с ним. Полноразмерный регуляторный участок для 35S CaMV по размеру приближается к 3 тыс. п.н. [2]. Однако, промоторной активностью обладают и меньшие по размеру участки: типичным промотором 35S CaMV, используемым в экспрессионных векторах для трансформации растений, является фрагмент длиной в 352 п.н. [3]. В большинстве случаев промотор 35S CaMV обеспечивает высокий уровень экспрессии гетерологичных генов в растениях, тем не менее, он

Сокращения: 4-МУ – 4-метилумбеллиферон; 4-МУГ – 4-метилумбеллиферил-D-глюкуронид; НТО – нетранслируемая область; CaMV – вирус мозаики цветной капусты; GUS – β-глюкуронидаза; SmAMP – антимикробный пептид Stellaria media.

Адрес для корреспонденции: Высоцкий Денис Александрович. 127550 Москва, Тимирязевская ул., 42. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. Электронная почта: e-mail: den\_vis@mail.ru

имеет ряд существенных недостатков. Из-за вирусного происхождения 35S CaMV инфицирование трансгенных растений вирусом CaMV может приводить к сайленсингу гетерологичного гена под контролем данного промотора [4]. Множество трансгенных растений проявляют феномен замолкания генов, основанный на гомологии последовательностей, который возникает при взаимодействии между собой тесно связанных повторяющихся элементов на одной молекуле ДНК или на гомологичных молекулах ДНК, в обеих аллельных и не-аллельных позициях [5]. Кроме этого, сайленсинг возникает, когда 35S CaMV используется в качестве одного и того же промотора двух и более генов в векторах для трансформации растений [6]. При переносе целевого гена в трансгенное растение, которое уже содержит ген с промотором 35S CaMV, введение добавочных копий этого промотора может усиливать метилирование и сайленсинг несвязанных гомологичных копий [7, 8].

Помимо 35S CaMV известны и другие вирусные промоторы, которые используются в биотехнологии растений [9]. Недавно удалось повысить эффективность промотора путем искусственной сборки из отдельных частей от разных вирусных промоторов [10]. Широкое использование вирусных промоторов обусловлено нехваткой хорошо охарактеризованных сильных конститутивных промоторов генов растений.

Для однодольных растений известны сильные промоторы, например, Act1 и ZmUbi, которые в однодольных трансгенных растениях по активности до 35 раз превосходили 35S CaMV [11, 12].

Для генетической инженерии двудольных растений также были найдены сильные и конститутивные растительные промоторы, но превосходство их над промотором 35S CaMV было не так существенно, как у однодольных. Промотор MtHP из растения Medicago truncatula в трансгенных растениях арабидопсиса, клевера (*Trifolium repens*) и люцерны (Medicago sativa) был примерно в полтора раза более эффективен по сравнению с промотором 35S CaMV [13]. По сравнению с 35S СаМV промотор гена АЦЦ-синтазы VR-ACS1 из золотистой фасоли (Vigna radiata) обеспечил в 6 раз более высокий уровень активности репортерного белка GUS в трансгенных растениях табака и арабидопсиса [14]. В тоже время явное превосходство промотора VR-ACS1 над вирусным было результатом не столько транскрипционной, сколько трансляционной активации.

В настоящее время возможности мультигенной трансформации делают доступными импорт в растения нескольких "целевых" генов, и создание трансгенных растений, одновременно производящих целый спектр соединений [15]. Для мультигенной трансформации необходимо использовать в одной генетической конструкции различные промоторы со схожим уровнем и профилем экспрессии, либо один и тот же промотор несколько раз.

Таким образом, в настоящее время существует дефицит сильных промоторов генов растений для эффективной экспрессии рекомбинантных генов в клетках двудольных растений.

Нас заинтересовали промоторы генов антимикробных пептидов pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 сорного растения мокрица (Stellaria media) в связи с тем, что экспрессия этих генов в мокрице находится на высоком уровне и усиливается при взаимодействии растения с фитопатогенными грибами и при обработке растений метилжасмонатом [16]. Экспрессия гена proSmAMP1 увеличивалась от 10 до 70 раз, при этом достигая уровня экспрессии гена "домашнего хозяйства"» β-актина. Экспрессия гена pro-SmAMP2 более подходила под определение конститутивной и также была на высоком уровне. Ранее нами методом "Прогулка по геному" была определена нуклеотидная последовательность промоторной области гена proSmAMP2 длиной 2160 п.н., включающая 40 п.н. 5'-HTO и показано, что ее делеционный вариант длиной 862 п.н. обеспечивал активность репортерного белка GUS, сравнимую с таковой под контролем 35S CaMV [17]. Целью настоящего исследования являлось установление нуклеотидной последовательности промоторной области гена pro-SmAMP1 и исследование возможностей использования ее в генетической инженерии двудольных растений.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование варианта промоторной области гена pro-SmAMP1. Геномную ДНК выделяли из тканей листьев Stellaria media (L.) <u>Vill.</u> с помощью GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit ("Sigma", США) согласно инструкции производителя.

Для клонирования промотора гена *pro-SmAMP1* использовали праймеры seq1-fw и seq1-rv (табл. 1), при этом обратный праймер комплементарен уникальному участку гена *pro-SmAMP1*, а прямой праймер был подобран исходя из предполагаемой гомологии промотора гена *pro-SmAMP1* с охарактеризованным ранее промотором гена *pro-SmAMP2* [17]. Полученный фрагмент ДНК, размером 1257 п.н., был клонирован в вектор рAL2-T и секвенирован.

In silico анализ последовательности промоторной области гена pro-SmAMP1. Биоинформатический анализ нуклеотидной последовательности промотора pro-SmAMP1 проводили в программах PLACE (https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace) [18] PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/ webtools/plantcare/html/) [19] в соответствии с руководством и рекомендациями разработчиков.

Праймер	Последовательность (5'-3')
seq1-fw	GTGTATATGAGGCTGATGATGG
Seq1-rv	GAACTGGAACTGGAGATGACC
fw	ACGGAATTCATATTTACATGAGCAAAGATGCTCAAG
fw	ACGGAATTCAATGTTATGGCGATATCAGGTGTC
fw	ACGGAATTCATTTCTCATTTGTATGGTCTACCAC
fw	ACAGAATTCTGCTTGGGGTTCACATTCCTAAC
fw	ACGGAATTCCAATAACTTGTTCTAGATTTTCAATAAG
rv	AGCCCATGGTTTCACTTGATTTTTTGTGACTAGC
	Праймер seq1-fw Seq1-rv fw fw fw fw fw fw fw fw rv

Таблица 1. Праймеры, использованные при клонировании промотора pro-SmAMP1 и при создании генетических конструкций

Получение делеционных вариантов промотора и генетических конструкций для трансформации растений. Для создания генетических конструкций было подобрано 5 прямых праймеров и один обратный, ограничивающие области промотора, длиной 481, 603, 714, 771, 1235 п.н. до сайта инициации трансляции. Обратный праймер был подобран "upstream" от сайта инициации трансляции ATG в положении -1. Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Все прямые праймеры содержали рестрикционный сайт *Eco*RI, а обратный праймер содержал сайт *Nco*I, необходимые для клонирования в растительный экспрессионный вектор рСАМВІА 1381Z.

ПЦР-амплификацию проводили смесью Pfu ("СибЭнзим", Россия) и Таq ("Синтол", Россия) ДНК полимераз в соотношении 1:10 в стандартном реакционном буфере для термостабильной полимеразы (60 мМ Tris-HCl, pH 8.5 при 25°С; 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 25 мМ KCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0.1% Тритон Х-100) с дНТФ. В качестве ДНК-матрицы использовали полученный фрагмент промоторной области гена pro-SmAMP1 размером 1257 п.н. Параметры температурных циклов: денатурация – 94°С, 30 с; отжиг праймеров – 60°С, 40 с; элонгация – 72°С, 90 с; 30 циклов. С использованием указанных праймеров были амплифицированы и клонированы в экспрессионный вектор рСАМВІА 1381 С пять делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1, в котором они контролировали экспрессию репортерного гена uidA, кодирующего фермент GUS. Генетические конструкции были обозначены как p1235, p771, p714, р603 и р481 в соответствии с длиной клонированного делеционного варианта промотора.

Агроинфильтрация растений Nicotiana benthamiana. Для агроинфильтрации использовали клетки Agrobacterium tumefaciens штамма GV3101, трансформированные плазмидами p1235, p771, p714, p603, p481 и pMOG35SintGus. В качестве контроля использовалась генетическая конструкция

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 63 № 5 2016

pMOG35SintGUS, в которой репортерный ген *uidA* находится под контролем промотора 35S CaMV. Подготовку штаммов *A. tumefaciens*, их инфильтрацию в растения *Nicotiana benthamiana*, а также экстракцию белков, проводимую на 7 день после инокуляции, выполняли по описанной ранее методике [17].

Трансформация растений. Для генетической трансформации использовали растения табака *Nicotiana tabacum* сорта Samsun-NN. Для трансформации использовали агробактериальные культуры на основе штамма AGL0, содержащие генетические конструкции p1235, p771, p714, p603 и p481. В качестве контрольной использовали конструкцию pMOG35SintGus, в которой ген *uidA* находится под контролем вирусного промотора 35S CaMV. Получение трансформантов растений табака проводили по методике, описанной ранее [16]. Первичные трансформанты выращивали в теплице при 26°С, освещенности 15 кЛ и 16/8 ч фотопериоде.

Получение транстенных растений поколений  $T_1-T_2$ . Семена поколений  $T_1-T_2$  были получены путем самоопыления трансгенных растений табака предыдущих поколений. Семена с каждого самоопыленного растения были собраны отдельно, стерилизованы и отобраны на среде Мурасиге-Скуга с гигромицином (50 мг/л) в течение 4 недель. Затем проводился анализ сегрегации растений на зеленые и белые с использованием критерия  $\chi^2$ . Зеленые растения адаптировали к почве в течении 3 дней и выращивали в теплице при 26°С, освещенности 15 кЛ и 16/8 ч фотопериоде.

Количественное определение активности репортерного белка β-глюкуронидазы (GUS). Измерение активности GUS в экстрактах растений табака проводили в соответствии с методом Jefferson и соавт. [20]. Для получения белковых экстрактов образцы тканей растений (около 10 мг) гомогенизировали в 150 мкл экстракционного буфера (50 мМ

Ген	Праймер	Последовательность (5'-3')	Ампликон, п.н.	
uidA	fw	GTGTATATGAGGCTGATGATGG	- 90	
	rv	GAACTGGAACTGGAGATGACC		
Actin	fw	CTGGAATTGCTGATAGGATGAG	111	
	rv	AACCTCCAATCCAAACACTATAC		

Таблица 2. Праймеры для измерения экспрессии генов uidA и Actin в трансгенных растениях табака

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, 10 мМ ЭДТА, 0.1% Triton X-100, 0.1% (w/v) натрий лауроилсаркозин, 10 мМ  $\beta$ -мер-каптоэтанол) и центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин и 4°C. Отбирали 100 мкл супернатанта и его повторно центрифугировали при аналогичных условиях, отбирали 70 мкл супернатанта для анализа. Полученные образцы хранили при  $-70^{\circ}$ C.

Измерения активности GUS проводили в течение 30 мин при 37°С в 100 мкл экстракционного буфера с добавлением 4-метилумбеллиферил-Dглюкуронида (4-МУГ) ("PhytoTechnology Laboratories", США) до конечной концентрации 1 ммоль. Реакцию останавливали добавлением 900 мкл 0.2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Флуоресценцию измеряли на флуориметре LS55 ("Perkin Elmer", США) при 455 нм и длине волны возбуждения 365 нм. Калибровку флуоресценции проводили с помощью раствора 4-метилумбеллиферона (4-МУ) в 0.2 моль Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Активность GUS рассчитывали после определения концентрации белка в белковых экстрактах по методу Bradford [21] с использованием раствора BSA в качестве стандарта. Для каждого образца (трансгенного растения) измерения проводили в трехкратной повторности.

Выделение РНК и синтез первой цепи кДНК. Из листьев растений выделяли суммарную РНК с использованием реагента Trizol ("Invitrogen", США) в соответствие с рекомендациями фирмы-изготовителя. Для устранения примесей геномной ДНК РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 RNase-Free ("Promega", США) и хранили при –70°С.

Первую цепь кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием олигонуклеотида oligodT ("Синтол") в качестве затравки и РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкоза мышей Молони (М-MLV). Конечная инкубационная смесь содержала 50 мМ Tris/HCl (pH 8.2), 8 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 мМ ДТТ, 50 мМ KCl, 10 мМ каждого из дНТФ, 100 пмоль праймера oligodT, 5 ед. ингибитора РНКаз, 25 ед. обратной транскриптазы и 1 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили 1 ч при 37°С.

**ОТ-ПЦР в реальном времени.** Оценку экспрессии гена *uidA* относительно величины экспрессии гена *Actin* проводили с использованием специфичных праймеров (табл. 2).

Праймеры подбирали таким образом, чтобы длина ПЦР-продукта составляла не более 150 п.н. Специфичность амплификации проверяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле, принимая образование 1 ампликона в качестве критерия специфичности. Дополнительно, для подтверждения специфичности используемых праймеров, продукты амплификации были клонированы в векторе pAL2-Т и секвенированы на автоматическом секвенаторе AhFexpress II ("Amersham Pharmacia Biotech", США). ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96™ ("BioRad", США) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ КСl, 10 мМ трис-HCl (pH 8.3), 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 5 ммоль каждого из дHT $\Phi$ , 1 е. а. Тад ДНК-полимеразы, 5 ммоль специфичных праймеров, 0.01 мкл продукта обратной транскрипции.

ПЦР в режиме реального времени проводили при следующих условиях: 1 цикл – 94°С 3 мин; далее 40 циклов 94°С – 15 сек, 60°С – 15 сек и 72°С – 30 сек. Специфичность амплификации после последнего цикла реакции проверяли анализом кривой плавления (от 55 до 95°С). Эффективность реакции определяли путем проведения ПЦР в реальном времени при разном разведении кДНК. Статистическую обработку данных ПЦР проводили с использованием программы qgene-96 [22]. Для расчета результатов использовали  $\Delta\Delta$ Сt метод [23].

Для расчета изменения экспрессии генов в опытных образцах по сравнению с контролем использовали формулу

$$\mathbf{C} = (1 + \mathbf{E}) - \Delta \Delta \mathbf{C} \mathbf{t},$$

где  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct,*uidA* –  $\Delta$ Ct,*Actin*;  $\Delta$ Ct,*uidA* – значения пороговых циклов для гена *uidA*;  $\Delta$ Ct,*Actin* – значения пороговых циклов для гена *Actin*.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семейство генов *pro-SmAMP* проявляет высокую степень сходства, поэтому с целью амплификации промоторной области гена *pro-SmAMP1* предварительно проводили выравнивание нуклеотидных последовательностей генов *pro-SmAMP* для выявления участка, уникального для гена *pro-SmAMP1*. К уникальному участку гена

**Таблица 3.** Мотивы в последовательности промотора гена *pro-SmAMP1* (по данным программ PLACE и Plant-CARE)

Мотивы	Описание
ABRE	Цис-элемент, участвует в ответе на действие АБК
ARE	Индукция при анаэробных условиях
Box 4	Часть консервативного участка ДНК, вовлеченного в ответ на свет
CAAT-box	Элемент корового промотора, характерный для генов с высокой экспрессией
GARE-motif	Регуляторный элемент, отвечающий за реакцию на гиббереллин
G-box	Регуляторный элемент, отвечающий за индукцию на свет
GCN4_motif	Элемент, ответственный за экспрессию в эндосперме
GT1-motif	Цис-элемент, участвующий в ответных реакциях на свет
I box	Часть элемента, ответственного за экспрессию в ответ на свет
LAMP-element	Часть элемента, ответственного за экспрессию в ответ на свет
MBS	Сайт связывания с ТФ МҮВ, индукция засухой
S box	Ответ на поранение и элиситоры фитопатогенных грибов
Skn-1_motif	Элемент, необходимый для экспрессии в эндосперме
TATA-box	Элемент корового промотора
TGACG-motif, CGTCA-motif	Регуляторный элемент, вовлеченный в метилжасмонатный путь передачи сигнала
TGA-element	Регуляторный элемент, отвечающий на действие ауксина
W-box	Ответ на поранение и элиситоры фитопатогенных грибов

*pro-SmAMP1* был подобран обратный праймер seq1-rv. Прямой же праймер подбирали исходя из возможной гомологии промоторных областей генов *pro-SmAMP1* и *pro-SmAMP2*, идентифицированного ранее [17]. Использование одного из прямых праймеров seq1-fw в сочетании с праймером seq1-rv (табл. 1) позволило амплифицировать фрагмент ДНК длиной 1498 п.н., включающий часть кодирующей последовательности гена *pro-SmAMP1* и фрагмент его промоторной области.

Анализ нуклеотидной последовательности полученного фрагмента методом секвенирования показал, что он содержит 5'-НТО размером 39 п.н. и часть, кодирующую область гена *pro-SmAMP1* размером 241 п.н. Также этот фрагмент ДНК содержит участок промоторной области гена *pro-SmAMP1* длиной 1218 п.н. относительно сайта инициации транскрипции. Нуклеотидная последовательность секвенированного фрагмента промотора показана на рис. 1.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности промоторной области гена *pro-SmAMP1* длиной 1257 п.н. с известной нуклеотидной последовательностью промоторной области гена *pro-SmAMP2* [17] выявил между ними существенные отличия. В частности, идентифицированный фрагмент промотора pro-SmAMP1 содержит в положениях -503 и -742 п.н. две уникальные вставки длиной 73 п.н. и 17 п.н., соответственно, а также ряд однонуклеотидных замен. Биоинформатический анализ нуклеотидной последовательности промотора pro-SmAMP1 позволил выявить ряд регулятор-

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 63 № 5 2016

ных мотивов, в том числе консервативную последовательность ТАТА-бокса, СААТ-мотив и последовательность CAN(A/C)(A/C)(C/A)C(C/A)N2A(C/A)сайта инициации транскрипции (рис. 1, табл. 3). Сочетание обнаруженных ТАТА-бокса и сайта инициации транскрипции характерно для промоторов генов растений с высоким уровнем экспрессии [24]. Кроме того, выявлен целый ряд цис-элементов и регуляторных мотивов, которые могут обуславливать зависимый от внешних условий характер экспрессии генов (табл. 3). Так, были обнаружены регуляторные элементы, отвечающие за реакцию на свет: GT1-мотив, I-бокс, G-бокс и LAMP-элемент [25, 26]. Обнаружены мотивы, ответственные за реакцию на действие фитопатогенов (S-бокс, W-бокс, TGACG-мотив и др.), абиотические воздействия (ARE, ABRE), а также определяющие локальный характер экспрессии (GCN4, Skn-I). Необходимо отметить, что положение, а также количество обнаруженных регуляторных элементов отличает промотор pro-SmAMP1 от изученного ранее промотора pro-SmAMP2. К примеру, ТGA-элемент, ответственный за реакцию на свет, у промотора pro-SmAMP1 находится в другой позиции, чем у pro-SmAMP2. LAMP-элемент есть только в промоторе pro-SmAMP1. Исходя из данных компьютерного анализа, промотор pro-SmAMP1 содержит большее количество G-боксов, один из которых находится внутри более короткого уникального фрагмента последовательности.

	↓-1235 Box 4		T3 (TC33 TC
+	ACGAAAAAAAAAIGIAAITAAIAIIIACAIGAGO	AAGAIGCICAAGCAAACIAGIAIIA	IACICAAIC
+	AGGAGAAATGTTATCAAAAGAAACTCCTGATATAAA	AATGTGAGAACTTTTAGCATATGTTC	ATTATACTA
	Box 4 GT1-motif	MBS	······································
+	Clin 1 world	IICACAACIGAIIIAAIIGCAAIIIC	GCITATIAC
+	GTAGTCATTTTATTATTTCCGCCTCTCTTTTATTA	GACATTATTAGTTTTTTTTATTATTG	TAGTCAGAT
	MBS	ARE	CARE-motuf
+	CTACGATAACTGTTAAATAATATGATGTACCAACGT	GAGAAACTATACCATGC <mark>TGGTTT</mark> AAA	TCTGAAACA
		CGTCA-	motif
+	GAIGTAGATACITGIGGCAACICAICAGGCIGIGI	STTGGTCCCACATGCCAACACT	ATTICCAAC
	CCATTTTCCCTTTATTATCCCAATCCCCACAATT		
т			GGACAAIGI
+		↓ -714 САТААGАТТААААТААТАТТТСТСАТ	TTGTATGGT
		(	boy
+	CTACACAAATAAAAGCAATATTCTAACATTATGTG	AGTGGTGTCACCGAGAGTTAGTGA <b>CA</b>	CATGGTGGC
	. (02		
+	GCCCATCATTTTCCTTCTTAAATTGCTTGGGGTTC	ACATTCCTAACCATGCOGTTCTTTTC	AAATGGGTA
	I-box		
+	ACCACATGAGCACTCATATCATCA	CACTCATATGAACCTTCTCAAACATA	AAGGTATGT
	-481		CGTCA-motif
+	TGTCACAATAACTTGTTCTAGATTTTCAATAAGAT	GATCATTAGTTTGCGTGAGCCGTAGA	GCAT CGTCA
+	ATAAATTCAAACATCACCTTGTGATAAACAA	<b>5ATAATA</b> CATTTTAACAAAATCACCC I-box	GATAACACT
	LAMP-element	TGA-element	
+		IAICICGII <b>AALGAL</b> AAIGAAAAAA	IGIGAGIIG
	ABRE		GCN4_motif
Т	W-box	ACGIACAIAAAGCCCAAGAIAIIAA	AGIGIGIGI
+	CAAT-box ABRE	box S CACACCAGCCACCGGTTATCATCAAG	CATTIGCCA
	Skin-1_motif MBS		
+	G-DOX ARE CGTAAACAAAATAATCTAACATGCAAACGGCAAAC	IAIA-DOX CCTTAACATTTCCGC <b>TATATATA</b> CCC	CTACGTACT
	TSS		+1 п н
+	CATCTACATTTCATCATAAACATAAACCTTACATA	саааадстадтсасааааааатсаад	TGAAAATG

**Рис. 1.** Нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующей промоторной области гена *pro-SmAMP1*. Распределение цис-элементов отображено цветом и обозначено подписями. Сайт начала трансляции (+1) выделен курсивом. Уникальные нуклеотидные вставки выделены рамкой. Вертикальными стрелками отмечены начальные точки нуклеотидных последовательностей 5'-делеционных вариантов. Первый нуклеотид кодона ATG, выделенного курсивом, обозначен как +1.



**Рис. 2.** Схема конструкций на основе растительного экспрессионного вектора pCAMBIA 1381Z для анализа экспрессии репортерного гена *uidA*. Растительный экспрессионный вектор pMOG35SintGUS, содержащий вирусный промотор 35S CaMV, использован в качестве контроля. Черным показана транслируемая область гена *uidA*; Int – модифицированный интрон каталазы клещевины; PIV2 – модифицированный интрон гена *ST-LS1* картофеля. Промоторы изображены в виде стрелок с соответствующими подписями.

На основе проведенного анализа нуклеотидной последовательности промотора pro-SmAMP1 были подобраны праймеры (табл. 1) для амплификации ее делеционных вариантов с целью последующей оценки их промоторной активности. При этом нами учитывалось, чтобы разные сочетания праймеров последовательно ограничивали уникальные вставки, отличающие данный промотор, и не нарушали цис-элементы. Каждый из полученных вариантов был слит с репортерным геном *uidA* в плазмиде pCAMBIA 1381Z. Полученные генетические конструкции для трансформации растений были обозначены соответственно как p1235, p771, p714, p603 и p481. Схема полученных конструкций показана на рис. 2.

## Оценка промоторной активности делеционных вариантов pro-SmAMP1 при транзиентной экспрессии репортерного гена uidA в растениях Nicotiana benthamiana

Эффективность каждого делеционного варианта промотора pro-SmAMP1 была изучена в 25 независимых растениях *N. benthamiana*. На каждом растении для анализа использовалось 2– 3 листа, в одну половину листа инфильтрировали штамм, несущий конструкцию с одним из делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1, в другую половину - штамм с контрольной плазмидой pMOG35SintGus, в которой репортерный ген *uidA* находится под контролем промотора 35S CaMV. На рис. 3 представлены средние значения активности GUS, которые были достигнуты при использовании каждого отдельного варианта генетической конструкции.

Как следует из рис. 3, средний уровень активности GUS в растениях, агроинфильтрированных генетическими конструкциями с различными де-

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 63 № 5 2016

леционными вариантами промотора рго-SmAMP1, составлял от 151 до 237 е. а. Сравнительный анализ делеционных вариантов промотора рго-SmAMP1 между собой показал, что наименее активным является делеционный вариант 714 п.н., в то время как остальные делеционные варианты между собой практически не различались. Как следует из приведенных результатов, значения уровней активности GUS в *N. bentamiапа* при использовании всех делеционных вариантов промотора рго-SmAMP1 более чем в три ра-







Рис. 4. Среднее значение активности  $\beta$ -глюкуронидазы в группах трансгенных растений табака поколения  $T_0$ , экспрессирующих ген *uidA* под контролем различных 5'-делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1 и промотора 35S CaMV.

за превышали уровни активности GUS с применением промотора 35S CaMV. Следует отметить, что известно не много растительных промоторов, главным образом генов актинов, способных конкурировать по активности с вирусным промотором 35S CaMV при транзиентной экспрессии рекомбинантных генов в растениях *N. bentamiana* [27, 28].

## Оценка промоторной активности делеционных вариантов pro-SmAMP1 в трансгенных растениях Nicotiana tabacum

В результате агробактериальной трансформации растений табака для каждого делеционного варианта промотора pro-smAMP1 были получены 20 независимых трансформантов  $T_0$ , устойчивых к селективному агенту и обозначенных нами в соответствии с названием использованных генетических конструкций. Активность репортерного фермента GUS определяли в экстрактах из листьев трансгенных растений табака. Результаты измерения активности GUS в трансгенных растениях табака поколения  $T_0$ , представлены на рис. 4.

Как видно из рис. 4, средние значения уровней активности GUS в трансгенных растениях поколения  $T_0$  p1235,  $T_0$  p771,  $T_0$  p714,  $T_0$  p603 и  $T_0$  p481 были в 4 и более раз выше, чем в растениях с промотором 35S CaMV  $T_0$  p35S. Следует отметить, что между группами трансгенных растений с разными делеционными вариантами промотора рго-SmAMP1 наблюдались некоторые различия в уровнях активности GUS, но они были не такими контрастными, как в сравнении с промотором 35S CaMV. В частности, наименьшая активность репортерного белка наблюдалась в группе  $T_0$  p771, в то время как остальные группы между собой не различались.

Необходимо отметить, что сравнивать между собой по промоторной активности отдельные делеционные варианты *pro-SmAMP1* на основании проведения измерений растений поколения T<sub>0</sub> не совсем корректно. Прежде всего, первичные трансформанты гетерогенны, т.е. могут содержать различное количество инсерций Т-ДНК, расположенных в разных участках генома, и обладать определенным уровнем сомаклональной изменчивости, что существенно влияет на уровень активности GUS в индивидуальных образцах. Кроме того, соотношение трансгенных растений с высокой и низкой активностью в популяциях может быть разным и, соответственно, в различной степени влиять на средние значения активности в группах. Поэтому заключение об эффективности отдельных делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1 целесообразно делать после анализа гомозиготных трансгенных растений поколения Т<sub>2</sub> с одной инсерцией Т-ДНК в геноме.

С целью изучения свойств делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1 в поколениях был изучен уровень активности GUS в потомстве трансгенных растений Т<sub>0</sub>. Для этого от трансгенных растений табака каждого варианта Т<sub>0</sub> p1235, T<sub>0</sub> p771, T<sub>0</sub> p714, T<sub>0</sub> p603 и T<sub>0</sub> p481 в результате самоопыления были получены семена T<sub>1</sub>. Не менее 200 семян от каждого растения Т<sub>0</sub>, представляющих одну популяцию, были асептически высажены на селективную среду с антибиотиком гигромицином. Через четыре недели после начала селекции была проанализирована сегрегация растений Т<sub>1</sub> на трансгенные (зеленые) и нетрансгенные (побелевшие). Среди всех вариантов, обозначенных нами соответственно T<sub>1</sub> p1235, T<sub>1</sub> p771, T<sub>1</sub> p714, T<sub>1</sub> p603 и T<sub>1</sub> р481, с использованием метода  $\chi^2$  были обнаружены популяции с расщеплением в соотношении 3 части зеленых и 1 часть белых растений. В частности, с моногенным наследованием были 4 популяции из группы T<sub>1</sub> p1235, 2 из T<sub>1</sub> p771, 1 из T<sub>1</sub> р714, 2 из T<sub>1</sub> р603, 2 из T<sub>1</sub> р481 и 2 из T<sub>1</sub> р35S. Такая сегрегация предполагает наличие Т-ДНК в одном локусе генома у исходных трансформантов  $T_0$ . Однако эти результаты не позволяют выяснить количество повторов Т-ДНК в одном локусе, в который произошла инсерция.

Для определения уровня экспрессии репортерного гена *uidA* по ферментативной активности его белкового продукта были изучены растения всех вариантов  $T_1$  p1235,  $T_1$  p771,  $T_1$  p714,  $T_1$  p603,  $T_1$  p481 и  $T_1$  p35S с моногенным наследованием T-ДНК (рис. 5).

Из рис. 5 видно, что высокий уровень активности GUS сохранился у всех трансгенных растений поколения T<sub>1</sub> с делеционными вариантами про-

мотора *pro-SmAMP1* и с вероятностью 95% был выше, чем в растениях  $T_1$  p35S. Одновременно растения всех групп с промотором *pro-SmAMP1* между собой существенно не отличались.

Для трансгенных растений вариантов  $T_1$  p1235,  $T_1$  p714 и  $T_1$  p481, проявивших наибольшую ферментативную активность GUS, был также измерен уровень накопления мРНК кодирующего его гена. Всего было проанализировано по пять растений в каждой группе. Уровень экспрессии репортерного гена *uidA* выражали как отношение его значения к уровню экспрессии референсного гена *Actin*. В ходе измерений экспрессии гена *uidA* были получены следующие результаты (рис. 6).

В трансгенных растениях табака уровень мРНК репортерного гена *uidA* был от 3.5 до 22.7 раз выше, чем уровень мРНК гена актина табака. Самый стабильный уровень накопления мРНК гена *uidA* был в растениях T<sub>1</sub> р481 и хорошо соотносился с уровнем активности GUS у этих же растений. Корреляция между активностью GUS и уровнем накопления мРНК также наблюдалась и для растений варианта T<sub>1</sub> p1235. Однако для растений Т<sub>1</sub> р714 наблюдались противоречия между транскрипционной и трансляционной активностью GUS. Такие отличия могут быть обусловлены различием стабильности мРНК и белка. Например, при адаптивных реакциях растительной клетки нередко наблюдается быстрый скачок экспрессии индуцибельных генов с последующим возвратом значений к уровню, наблюдаемому до стрессовых воздействий. Кроме того, в растениях активная форма белка GUS характеризуется значительным периодом полужизни, поэтому быстрые уменьшения транскрипции репортерного гена uidA не приводят к быстрым изменениям активности репортерного белка GUS [29].

Кроме того, важной характеристикой любого промотора является распределение его транскрипционной активности по разным органам трансгенных растений. Такие измерения были проведены на трансгенных растениях *N. tabacum* поколения  $T_1$  (данные не приводятся). Наиболее высокая активность репортерного белка наблюдалась в листьях, стеблях и пыльниках трансгенных растений табака. При этом активность GUS в корнях, бутонах, пыльце и семенах была существенно ниже (не более 45% от уровня активности в листьях).

Для получения гомозиготных растений поколения  $T_2$  использовали растения  $T_1$  из популяций с моногенным наследованием трансгенов, чтобы избежать влияния количества независимых инсерций T-ДНК на уровень активности GUS. В качестве родительских растений  $T_1$  отбирали образцы с уровнем активности примерно в два раза выше, чем у остальных растений

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 63 № 5 2016



**Рис. 5.** Среднее значение активности  $\beta$ -глюкуронидазы в группах трансгенных растений табака поколения  $T_1$ , экспрессирующих ген *uidA* под контролем различных 5'-делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1 и промотора 35S CaMV.



Рис. 6. Экспрессия гена *uidA*, нормализованная относительно уровня экспрессии референсного гена *Actin*, в трансгенных растениях табака  $T_1$  p1235,  $T_1$  p714 и  $T_1$  p481. Цифры по оси абсцисс указывают номера линий и группу индивидуального растения, по оси ординат - значение экспрессии относительно экспрессии гена *Actin*.

этой же популяции, что предполагало их гомозиготность по локусам T-ДНК. Все трансгенные растения  $T_2$  были устойчивы к гигромицину. Для анализа активности GUS использовалось 4 растения из каждой популяции с моногенным наследование T-ДНК в группах  $T_1$  p1235,  $T_1$  p771,  $T_1$  p603,  $T_1$  p481, и 8 растений из группы  $T_1$  p714.

Высокая активность GUS сохранилась у трансгенных растений табака поколения  $T_2$  со всеми делеционными вариантами промотора pro-SmAMP1 (рис. 7). При этом средние значения уровней активности GUS в 9 независимых попу-



Рис. 7. Активность  $\beta$ -глюкуронидазы в независимых гомозиготных линиях трансгенных растений табака поколения  $T_2$ , экспрессирующих ген *uidA* под контролем различных 5'-делеционных вариантов промотора pro-SmAMP1.

ляциях из 11 вне зависимости от группы были сопоставимы 18-23 нмоль 4-МУ/(мг мин) и не различались.

Это свидетельствует о том, что все делеционные варианты промотора pro-SmAMP1 обеспечивают стабильный уровень экспрессии контролируемого ими гена в определенной степени независимо от места интеграции в геном растения.

Две остальные популяции № 5  $T_2$  p1235 и № 19  $T_2$  p771 демонстрировали уровень активности GUS около 31—37 нмоль 4MU/(мг мин), что примерно в 2 раза выше, чем в остальных популяциях. Возможно, что в этих двух популяциях имелось две тесно сцепленных копии T-ДНК, которые при сегрегации наследовались совместно и обеспечивали более высокий уровень активности GUS.

В данных исследованиях в качестве сравнительного контроля был использован сильный и конститутивный вирусный промотор 35S CaMV, при использовании которого уровень активности GUS в отдельных трансформантах табака сорта Samsun-NN был не более 1.8 нмоль 4-МУ/(мг мин) (рис. 5). В целом этот уровень активности сопоставим с результатами других исследований, в которых сообщается о 0.9–3.3 нмоль 4-МУ/(мг мин) [10, 30]. В тоже время есть исследования, в которых приводятся экспериментальные данные о достижении 10 нмоль 4-МУ/(мг мин) у отдельных линий табака при использовании промотора 35S CaMV [14]. С учетом этих данных необходимо отметить, что в ряду последовательных поколений T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> уровень активности GUS у трансгенных растений табака со всеми делеционными вариантами промотора pro-SmAMP1 не менее двух раз выше, чем у растений с вирусным промотором 35S CaMV.

В этой связи, использование самого короткого делеционного варианта промотора длиной -481 п.н. целесообразно с точки зрения генетической инженерии растений.

Данная работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации, соглашение № RFMEFI60414X0028. Работа была выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования "Биотехнология" ФГБНУ ВНИИСБ, Москва.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Potenza C., Aleman L., Sengupta-Gopalan C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. 2004. V. 40. P. 1–22.
- Odell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter // Nature. 1985. V. 313. P. 810– 812.
- Fang R.X., Nagy F., Sivasubramaniam S., Chua N.H. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants // Plant Cell. 1989. V. 1. P. 141–150.
- Al-Kaff N.S., Kreike M.M., Covey S.N., Pitcher R., Page A.M., Dale P. J. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene // Nature Biotechnol. 2000. V. 18. P. 995–999.
- Jakowitsch J., Papp I., Moscone Eduardo A., Van Der Winden J., Matzke M., Matzke Antonius J. M. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters intrans // Plant J. 1999. V. 17. P. 131–140.
- McCabe M., Mohapatra U., Debnath S., Brian Power J., Davey M. Integration, expression and inheritance of two linked T-DNA marker genes in transgenic lettuce // Mol. Breeding. 1999. V. 5. P. 329–344.
- Dong Y., von Arnim A. Novel plant activation-tagging vectors designed to minimize 35S enhancer-mediated gene silencing // Plant Mol. Biol. Rep. 2003. V. 21. P. 349–358.
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA // EMBO J. 2000. V. 19. P. 5194-5201.
- Porto M.S., Pinheiro M. P., Batista V.G., dos Santos R.C., Filho Pde A., de Lima L. M. Plant promoters: an approach of structure and function // Mol. Biotechnol. 2014. V. 56. P. 38–49.
- Kumar D., Patro S., Ranjan R., Sahoo D. K., Maiti I.B., Dey N. Development of useful recombinant promoter and its expression analysis in different plant cells using confocal laser scanning microscopy // PLoS One. 2011. V. 6. P. e24627.
- 11. Christensen A.H., Sharrock R.A., Quail P.H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expres-

sion and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation // Plant Mol. Biol. 1992. V. 18. P. 675–689.

- McElroy D., Zhang W., Cao J., Wu R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation // The Plant Cell Online. 1990. V. 2. P. 163–171.
- 13. Xiao K., Zhang C., Harrison M., Wang Z.-Y. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants // Mol. Breeding. 2005. V. 15. P. 221–231.
- Cazzonelli C.I., McCallum E.J., Lee R., Botella J.R. Characterization of a strong, constitutive mung bean (Vigna radiata L.) promoter with a complex mode of regulation in planta // Transgenic Res. 2005. V. 14. P. 941–967.
- Zhu C., Naqvi S., Gomez-Galera S., Pelacho A.M., Capell T., Christou P. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 548–555.
- Shukurov R.R., Voblikova V.D., Nikonorova A.K., Komakhin R.A., Komakhina V.V., Egorov T.A., Grishin V.E., Babakov V.A. Transformation of tobacco and Arabidopsis plants with Stellaria media genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // Transgenic Res. 2012. V. 21. P. 313–325.
- Стрельникова С.Р., Вобликова В.Д., Шукуров Р.Р., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Изучение нового растительного промотора гена proSmAMP2 из Stellaria media методом агробактериальной инфильтрацией растений // Биотехнология. 2014. (3). Р. 8–17.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T. Plant cisacting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 297–300.
- Lescot M., Dehais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y. et al. PlantCARE, a database of plant cisacting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. 325–327.
- 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. 6. P. 3901–3907.

- 21. *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.
- Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR // Biotechniques. 2002. V. 32. P. 1372–1374, 1376, 1378–1379.
- Bustin S. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays // J. Mol. Endocrinol. 2000. V. 25. P. 169–193.
- Sawant S., Singh P., Gupta S., Madnala R., Tuli R. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants // Journal of Genetics. 1999. V. 78. P. 123–131.
- Escobar M.A., Franklin K.A., Svensson A.S., Salter M.G., Whitelam G.C., Rasmusson A.G. Light regulation of the Arabidopsis respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2710–2721.
- Grob U., Stuber K. Discrimination of phytochrome dependent light inducible from non-light inducible plant genes. Prediction of a common light-responsive element (LRE) in phytochrome dependent light inducible plant genes // Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. P. 9957–9973.
- McElroy D., Blowers A.D., Jenes B., Wu R. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 50 region for use in monocot transformation // Mol. Gen. Genet. 1991. V. 231. P. 150–160.
- An Y.Q., McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., Chambliss S., Meagher R.B. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues // Plant J. 1996. V. 10. P. 107–121.
- Quaedvlieg N.M., Schlaman H.M., Admiraal P., Wijting S., Stougaard J., Spaink H. Fusions between green fluorescent protein and β-glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants // Plant Mol. Biol. 1998. V. 38. P. 861–873.
- Schnurr J.A., Guerra D.J. The CaMV-35S promoter is sensitive to shortened photoperiod in transgenic tobacco // Plant Cell Rep. 2000. V. 19. P. 279–282.