

ПОРІВНЯННЯ РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА GFP ПРИ AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНІЙ ТРАНЗІЄНТНІЙ ТРАНСФОРМАЦІЇ МАХОРКИ *NICOTIANA RUSTICA* L. КОНСТРУКЦІЯМИ З РІЗНИМИ ПРОМОТОРНИМИ ПОСЛІДОВНОСТЯМИ

О.І. ВАРЧЕНКО^{1,2}, М.В. КУЧУК¹, М.Ф. ПАРІЙ^{2,3}, Ю.В. СИМОНЕНКО^{1,2}

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

² Всеукраїнський науковий інститут селекції, Київ

³ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

E-mail: okvarchenko@gmail.com

Промотори – це ключові елементи рівня експресії генів, тому їх вибір є важливим етапом в генно-інженерних дослідженнях. Репортерний ген gfp, що кодує зелений флуоресцентний білок (GFP), транз'єєтно експресували в листкових тканинах махорки Nicotiana rustica L. Порівняно з іншими видами роду Nicotiana вона має великий потенціал для експресії гетерологічних білків, велику вегетативну біомасу, легко інфільтрується, і при цьому, є невибагливою при вирощуванні. В роботі використовували шість створених нами генетичних конструкцій, які відрізнялися промоторними послідовностями: 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капуста – Cauliflower Mosaic Virus (35S CaMV), подвійний 35S промотор (D35S CaMV), промотори генів RbcS1B та RbcS2B, що кодують малу субодиницю рибулозобісфосфаткарбоксилази (Rubisco), виділених з різушки Таля (Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.), та промотори генів LHB1B1 та LHB1B2 з A. thaliana, що кодують хлорофіл a-b зв'язуючі білки. Експресію гена gfp детектували на 7 день після інфільтрації візуально, спектрофлуориметрично та за білковим вмістом (метод Бредфорда). Найвищий рівень експресії спостерігали при використанні подвійного 35S промотору (D35S CaMV), а найнижчий – при використанні промотору гена LHB1B1.

Ключові слова: махорка, *Nicotiana rustica* L., промотор, ген gfp, зелений флуоресцентний білок (GFP), транз'єєтна експресія, генетичні конструкції, спектрофлуориметричний аналіз, кількісний білковий аналіз.

Вступ. Рівень експресії генів регулюється серією процесів на рівні транскрипції, трансляції та пострансляційних модифікацій білків [1]. Однією з основних точок доступу для зміни рівня експресії генів є контроль синтезу транскриптів на рівні промоторів. Таким чином, в генетичній інженерії важливим етапом роботи є вибір

промоторів, які б можна було використовувати при створенні генетичних конструкцій для забезпечення широкого спектра рівня експресійних можливостей [2].

Синтетична біологія об'єднує набір методів для проектування та розробки нових біомолекулярних компонентів і їх використання для перепрограмування організмів. Ряд центральних елементів є суттєвими в проектуванні рекомбінантних систем експресії [3, 4], таких як транскрипційні промотори [5]; 5' та 3' послідовності, що не транслюються [6–8]; транскрипційні енхансери; власне послідовності генів; термінатори; наявність інтронів та сигнальних пептидів тощо [9].

Розвиток галузі промоторної інженерії відбувається шляхом пошуку нових промоторів, змінюю існуючих шляхом мутацій або синтетично створених. Водночас, вона може допомогти створити динамічний діапазон необхідний для генетичної інженерії. Прості касети «промотор-ген» є важливим компонентом генно-інженерної парадигми з тих пір, як були вперше описані, і з того часу промотори стали координаційними точками в синтетичній біології [10].

Промотори, що використовуються в біотехнологічних цілях, можуть бути згруповані в наступні класи: а) конститутивні промотори, під контролем яких гени активні в більшості тканин і стадіях розвитку; б) тканино-специфічні, що забезпечують специфічну для тканини або стадії розвитку експресію генів; в) індукцибельні, робота яких регулюється застосуванням зовнішнього хімічного або фізичного сигналу; д) синтетичні – штучно скомбіновані, що містять певні регуляторні елементи, які можуть бути розташовані поряд з (або всередині) промоторних послідовностей [11].

© О.І. ВАРЧЕНКО, М.В. КУЧУК, М.Ф. ПАРІЙ, Ю.В. СИМОНЕНКО, 2020

Експресія генів під контролем промоторів, які класифікуються як конститутивні, можуть проявляти помірні рівні експресії в багатьох тканинах, і вищі в меристематичних або в судинних. Вони часто використовуються при створенні трансгенних рослин, оскільки забезпечують експресію трансгена майже у всіх тканинах. Конститутивні промотори, що використовуються при генетичній трансформації, зазвичай, виділені з різних вірусів рослин, бактерій або рослинних генів.

35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (35S CaMV) [12] є одним з найбільш широко використовуваних для фундаментальних досліджень і практичного застосування при створенні трансгенних рослин. Конститутивна експресія генів, що контролюється цим промотором, є відносно високою в різних тканинах більшості рослин. Така сильна експресія забезпечується результатом адитивного ефекту багатьох тканино-специфічних елементів. Наприклад, сайт-специфічна мутація деяких елементів в 35S CaMV промоторі призводила до втрати експресії в певних тканинах або при певних умовах. Модель, запропонована для 35S CaMV промотору, що складається з рядів окремих елементів, і кожен з яких сприяє загальній активності промотору, залишається центральною для концептуального розуміння його функціональності [13].

Кау зі співавт. сконструювали варіант 35S CaMV промотору таким чином, що 250 пар основ перед сайтом ініціації були тандемно подвоєні [14]. Подвоєна ділянка виступала як сильний енхансер гетерологічних промоторів і підвищувала активність сусідніх та дивергентно транскрибованих перенесених генів. Такий оптимізований елемент використовують для отримання високого рівня експресії чужорідних генів у трансгенних рослинах [14].

Гени рослин, що мають високий рівень експресії, також є джерелом сильних конститутивних промоторів, наприклад, гени убіхітину, актину, тубуліну, еукаріотичних факторів ініціації тощо. Промотори цих генів є високоактивними майже у всіх органах і тканинах та впродовж більшої частини життєвого циклу рослин [15].

Вірусні гетерологічні промотори можуть генерувати занадто високу експресію генів для багатьох процесів, тому для регулювання рівня

експресії трансгенів використовують ендогенні рослинні промотори, щоб забезпечити необхідний діапазон експресії перенесених генів [16].

Рибуллозобісфосфаткарбоксилаза (Rubisco) є найбільш поширеним білком у рослинах, який бере участь у процесі фотосинтезу, тому очікується, що ці гени мають сильні тканино-специфічні промотори. У рослинах члени сімейства генів *rbcS*, що кодують малу субодиницю Rubisco, є одними з найбільш охарактеризованих світло-індуцибельних генів. Відомо, що промотори цих генів містять комплекс негативних і позитивних регуляторних елементів, які надають світлову і тканино-специфічну експресію в трансгенних рослинах [17].

Світлозалежні білки присутні в різних рослинах. Для забезпечення ефективної передачі енергії збудження в реакційні центри, де відбувається перерозподіл зарядів, для координації фотосинтетичних пігментних молекул залучаються різні ферменти. Світлозбиральні та світлорозсіювальні процеси є тісно пов'язаними, вони залучені в роботу світлозбирального комплексу. Білки, що зв'язують молекули хлорофілу *a-b*, входять до складу світлозбирального хлорофілбілкового комплексу II, і промотори цих генів можуть бути джерелом для використання в генетичній інженерії [18].

Результати наших експериментів свідчать про можливість використання одного з видів тютюну, а саме махорки (*Nicotiana rustica* L.), для транз'єнтної експресії репортерного гена *gfp* та накопичення рекомбінантного білка GFP. У представленому дослідженні наведено результати порівняльного аналізу роботи шести різних промоторів. Нами протестовано шість генетичних конструкцій з різними промоторами та визначено різницю рівня експресії гена *gfp* залежно від обраних промоторів.

Матеріали та методи. Штам бактерій та генетичні конструкції. Для дослідження рівня експресії гена *gfp* були використані шість створених нами, за допомогою методу модульного молекулярного клонування *Golden Gate* (MoClo), генетичних конструкцій з різними промоторними послідовностями (pSPV2301, pSPV2302, pSPV2303, pSPV2304, pSPV2305 та pSPV2306) (рис. 1) [19].

Всі транскрипційні одиниці, крім промоторів, додатково містили такі елементи: 5'-послі-

	LB				RB
1 pSPV2301	p35S CaMV	5'UTR Ω TMV	GEP (<i>A. victiria</i>)	ter 35S CaMV	
1 pSPV2302	pRbcS1B A.t.	5'UTR Ω TMV	GEP (<i>A. victiria</i>)	ter 35S CaMV	
1 pSPV2303	pD35S CaMV	5'UTR Ω TMV	GEP (<i>A. victiria</i>)	ter 35S CaMV	
1 pSPV2304	pRbcS2B A.t.	5'UTR Ω TMV	GEP (<i>A. victiria</i>)	ter 35S CaMV	
1 pSPV2305	pLHB1B1 A.t.	5'UTR Ω TMV	GEP (<i>A. victiria</i>)	ter 35S CaMV	
1 pSPV2306	pLHB1B2 A.t.	5'UTR Ω TMV	GEP (<i>A. victiria</i>)	ter 35S CaMV	

Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК використаних конструкцій

довність Ω, що не транлюється (5'UTR) вірусу тютюнової мозаїки (TMV); кодує послідовність гена *gfp*, виділеного з *Aequorea victoria* та 35S термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти (35S CaMV) разом з сигналом поліаденілювання та 3'-послідовністю, що не транлюється.

Ген *gfp*, що знаходиться під контролем певного промотору, можна використовувати для оцінки рівнів експресії інших білків, гени яких також знаходяться під контролем того ж промотору. Білок GFP характеризується флуоресценцією в зеленій області (з максимумом емісії при довжині хвилі 509 нм) при опромінуванні ультрафіолетовим або синім світлом. Флуоресценцію білка GFP (рис. 2) детектували на 7 день після інфільтрації. В якості негативного контролю використовували тканини рослин, що інфільтрували штамом GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*, що не містив вектор з геном *gfp*, та тканини, які не були інфільтровані. Нами було протестовано шість різних промоторів, а саме 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (35S CaMV), подвійний 35S промотор (D35S CaMV), промотори генів RbcS1B та RbcS2B, що кодуєть малу субодиницю рибулозобісфосфаткарбоксілази (Rubisco), виділених з різущки Таля та промотори генів LHB1B1 та LHB1B2 з *A. thaliana*, що кодуєть хлорофіл a-b зв'язуючі білки.

Нічну культуру *Agrobacterium tumefaciens*, штам GV3101, який попередньо трансформували кожною окремою конструкцією, нарощували в середовищі LB [20], доповненому 50 мг/л рифампіцину, 25 мг/л гентаміцину та 100 мг/л канаміцину.

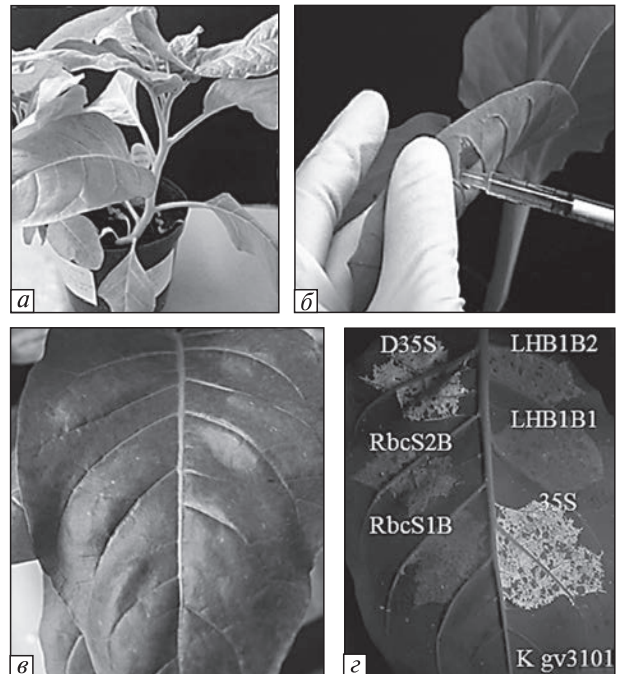


Рис. 2. Транз'єнтна експресія гена *gfp* в листках махорки *N. rustica* L.: а – махорка *N. rustica* L., б – інфільтрація листка за допомогою шприца, в – листок 7 днів після інфільтрації (денне світло); г – листок 7 днів після інфільтрації (ультрафіолетове світло)

Рослинний матеріал. Махорку (*Nicotiana rustica* L.) вирощували в умовах теплиці при 25/18 °С та 16/8 годинному фотоперіоді (день/ніч відповідно). Для інфільтрації використовували листки середнього ярусу 4-х тижневих рослин. Насіння махорки було люб'язно надано к.б.н. В.Б.Белокуровою з Колекції зародкової плазми рослин флори України та світової флори (ІК-БГІ НАН України).

Транз'єнтна експресія гена *gfp*. Рослини махорки трансформували транз'єнтно. Нічну культуру агробактерій дорощували до оптичної щільності суспензії, що дорівнювала одиниці ($OD_{600} = 1$), та ресуспендували у буфері для інфільтрації (10 мМ $MgSO_4$, рН 5,6–5,8) з кінцевою оптичною щільністю $OD_{600} = 1$. Генетичні вектори вводили в рослинні клітини шляхом інфільтрації листків за допомогою шприца суспензією агробактерій (*Agrobacterium tumefaciens*) [21].

Флуоресценцію білка GFP детектували на 7 день після інфільтрації візуально в ультрафіолетовому світлі, далі проводили спектрофлуориметричний аналіз на флуоресцентному спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» (збудження при довжині хвилі 395 нм, емісія при 509 нм).

Виділення білків та кількісний білковий аналіз. Водорозчинні білки виділяли в буфері для екстракції (PBS), що складався з наступних елементів: 80 мМ Na_2HPO_4 , 20 мМ NaH_2PO_4 та 100 мМ NaCl, рН 7–7,5 [22]. Тканини рослин *N. rustica* L. розтирали з буфером для екстракції в попередньо охолодженій ступці (+4 °С) в концентрації 1 : 3 (300 мкл буфера на 100 мг тканини), після чого суспензію осаджували (+4 °С, 14000 грт, 30 хв). Надосад використовували для визначення кількісної концентрації білків за Бредфордом [23].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel з визначенням середнього значення та стандартного відхилення показників для кожного із експериментів. Для статистичної обробки результатів спектрофлуориметричного аналізу середнє значення визначали через логарифмічне перетворення показників спектрофлуориметра.

Результати досліджень та їх обговорення. Незважаючи на те, що для продукції рекомбінантних білків широкого спектру застосування найчастіше використовують мікроорганізми, клітинні культури або тварини, рослинні системи є перспективним шляхом отримання терапевтично цінних білків. На даний час шляхом транз'єнтної експресії із рослин було отримано великий набір рекомбінантних білків, включаючи такі фармацевтично цінні білки як інтерферон, соматотропін, апролін, різні антигени та антитіла тощо [24]. Останнім часом було

перевірено багато різних сільськогосподарських культур (рис, пшениця, люцерна, картопля) на ефективність використання як об'єктів для транз'єнтної експресії різних білків, але рослини роду *Nicotiana* L. виявились найкращими об'єктами для агробактеріальної транз'єнтної трансформації. Серед видів цього роду найчастіше використовують *N. benthamiana* Donn, який є модельним видом для дослідів по транз'єнтній експресії генів. Крім цього, до експериментів залучались інші види, такі як *N. excelsior* J.M. Black, *N. × excelsiana* тощо, особливо при вакуумній інфільтрації рослин [25, 26]. Після *N. benthamiana* на другому місці по ефективності використання знаходиться тютюн (*N. tabacum* L.), який також показує високий рівень накопичення рекомбінантних білків [27]. Для отримання комерційних кількостей рекомбінантного продукту необхідно дві умови: високий рівень експресії в рослинній системі та велика біомаса рослин. Рослини виду *N. benthamiana* мають найвищий рівень експресії, але невелику біомасу, а *N. tabacum* – навпаки: невеликий рівень експресії, але велику біомасу (потенційний урожай біомаси може досягати 80–100 т/га). Встановлено, що рівень експресії гетерологічних білків в рослинах махорки співставний з рівнем експресії білків у *N. benthamiana* (неопубліковані дані), а потенційний урожай її біомаси наближається до показників тютюну. Інші переваги використання махорки полягають у її невибагливості та легкості вирощування в теплиці, тому нами як основний об'єкт дослідження було обрано саме махорку.

За результатами проведеного нами спектрофлуориметричного аналізу встановлено, що найвищий рівень експресії ген *gfp* проявляв при використанні в конструкції D35S CaMV промотору (табл. 1) і дорівнював $1,063 \pm 0,031$ у.о. (рис. 3). У цьому випадку сумарна концентрація водорозчинних білків в агроінфільтрованих тканинах махорки також була максимальною – 1921 ± 2 мкг/мл. При цьому найнижчий показник флуоресценції – $0,116 \pm 0,005$ у.о. та найнижчу концентрацію водорозчинних білків – $1076 \pm 2,65$ мкг/мл було показано при використанні в генетичній конструкції промотору гена LHB1B1.

35S CaMV промотор найчастіше використовується для експресії трансгенів в рослинах,

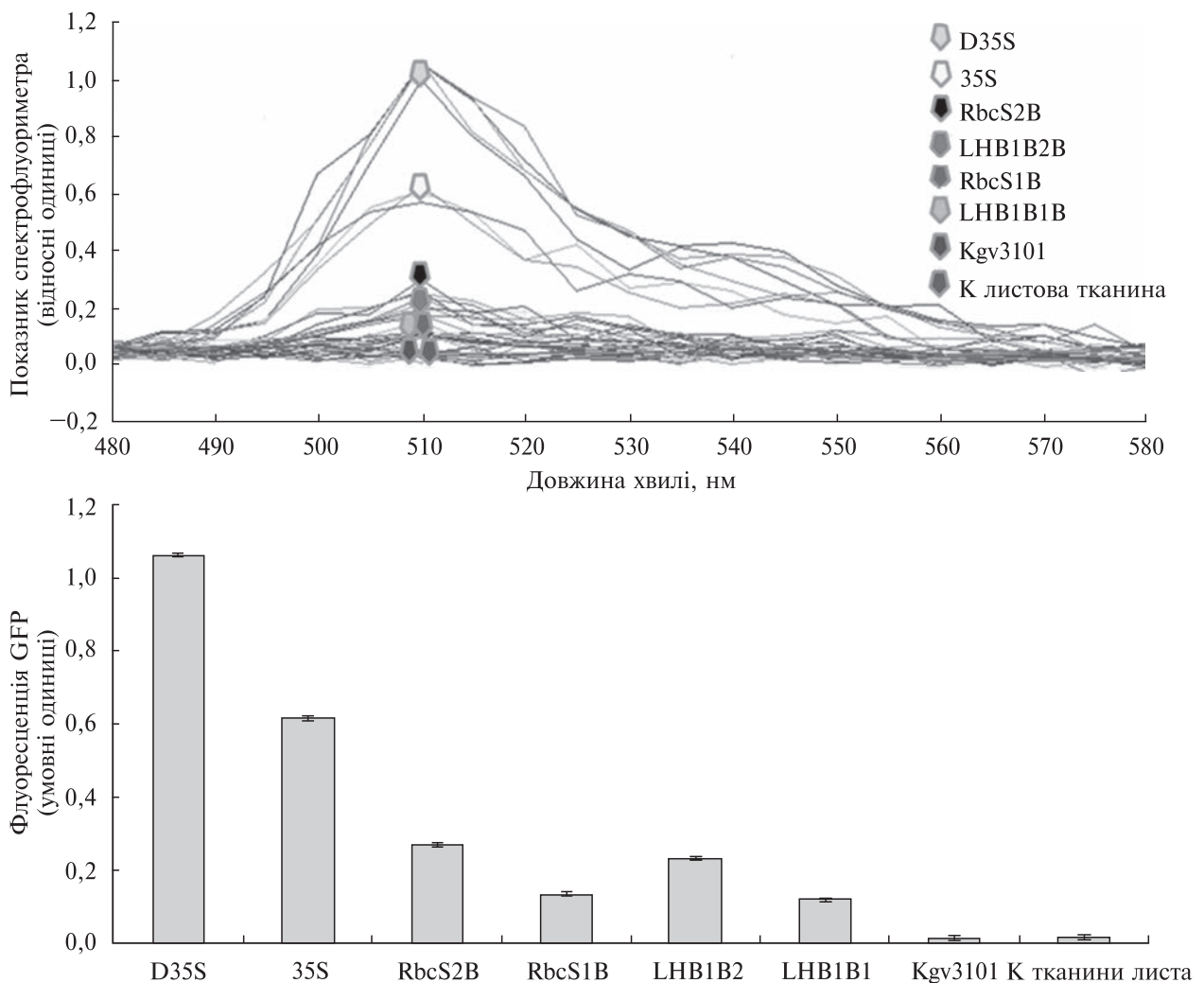


Рис. 3. Спектрофлуориметричний аналіз рівня інтенсивності флуоресценції білка GFP в листових тканинах махорки

і забезпечує високий рівень конститутивної експресії у дводольних видів та дещо слабший у однодольних. Удосконалений промотор D35S CaMV має дублювання нуклеотидної послідовності з -343 до -90 . Wally і співавт. показали, що при використанні такого промотору рівень експресії гена β -глюкуронідази в трансгенних лініях моркви (*Daucus carota* L.) збільшувався вдсятеро порівняно з 35S CaMV промотором [28]. В наших дослідженнях при транз'єнтній експресії гена *gfp* її рівень був в 1,7 разів вищим при використанні D35S CaMV промотору порівняно з 35S CaMV промотором. Таке підвищення експресії генів фіксу-

ють і інші дослідники на різних культурах та з іншими генами.

Наприклад, при порівнянні рівнів експресії гена *gus*, що контролювався D35S CaMV та 35S CaMV промотором, було відзначено підвищення рівня експресії при використанні подвійного D35S CaMV промотору в трансгенних бородатих коренях огірка (*Cucumis sativus*) [29]. Patro зі співавт. проводили транз'єнтну трансформацію протопластів тютюну векторами з геном *gus* під контролем D35S CaMV та показали в 4,3 рази вищий рівень експресії гена *gus*, ніж при використанні 35S CaMV промотору [29].

За результатами досліджень Li і співавт. відмічали високий рівень транзйентної та стабільної експресії гена *egfp*, який контролювався D35S CaMV промотором в різних тканинах і органах винограду (*Vitis vinifera*) [30], що підтверджується в наших експериментах для махорки.

Використання *gfp* гена для транзйентної експресії в тканинах рослин, у ряді випадків, дещо обмежена, внаслідок низької чутливості методу детекції. Живі клітини в зеленій області спектра мають сильну автофлуоресценцію, тому для отримання сигналу флуоресценції від GFP, який вдвічі перевищує фоновий в клітині, потрібно 1 мкМ GFP. GFP з більш високим коефіцієнтом поглинання (наприклад, мутантний EGFP) зменшує границю для виявлен-

ня флуоресценції білка в 6–10 разів (0,1 мкМ GFP). Тому, для детекції сигналу флуоресценції від клітини потрібна висока концентрація флуоресцентного білка, експресію якого може забезпечити сильний промотор. Крім цього, чутливість детекції флуоресцентного білка може різко підвищитись за рахунок його кластеризації, зумовленої сигналом внутрішньоклітинної локалізації (сигнального пептида). Успішне виявлення білка GFP сильно залежить від сили та джерела збудження, а саме використаної UV-лампи. Необхідно відмітити, що рослини із теплиць часто мають більше фенольних і інших сполук, що характеризуються блакитно-синьою автофлуоресценцією, і можуть маскувати флуоресценцію GFP [32–35].

При вивченні транзйентної експресії гена *gus* в тютюні *N. tabacum* L. Карупнік і співавт. відмітили, що використання промотору гена LHB1B2 призвело до зменшення рівня експресії гена *gus* в 3,2 рази порівняно із 35S CaMV промотором [36]. Нами ж показано, що рівень експресії гена *gfp* в листових пластинах махорки при використанні промотору гена LHB1B2 за спектрофлуориметричним аналізом дорівнював $0,231 \pm 0,023$ у.о. і був в 2,6 разів нижчим, ніж під контролем 35S CaMV промотору, та в 4,5 рази нижчим, ніж при використанні D35S CaMV промотору. Сумарна концентрація водорозчинних білків при транзйентній експресії гена *gfp* під контролем промотору гена LHB1B2, 35S CaMV та D35S CaMV промоторів складала $1372 \pm 3,6$; 1643 ± 2 та 1921 ± 2 мкг/мл відповідно (табл. 2). При цьому сумарна концентрація білків у контрольних екстрактах (К GV3101 та К неінфільтрованої тканини листка) дорівнювала 546 ± 2 мкг/мл і $569 \pm 3,6$ мкг/мл відповідно (рис. 4). Збільшення сумарної концентрації білків абсолютно корелює з підвищенням рівня флуоресценції GFP за спектрофлуориметричним аналізом.

Використання промоторів генів сімейства *rbcS* на різних культурах в генетичній інженерії показує досить високий рівень експресії перенесених генів в різних тканинах.

Сui і співавт. у своїй роботі порівнювали рівні експресії перенесеного гена *gus*, керовані промотором RbcS сої (*Glycine max*) та 35S CaMV промотором, в листках, пагонах та коренях

Таблиця 1. Статистичний аналіз рівня інтенсивності флуоресценції GFP в листках махорки

Промотор	Середнє значення	Похибка середнього значення (-)	Похибка середнього значення (+)
D35S	1,06	0,03	0,03
35S	0,62	0,02	0,02
RbcS2B	0,27	0,02	0,02
RbcS1B	0,13	0,01	0,01
LHB1B2	0,23	0,02	0,02
LHB1B1	0,12	0	0
К GV3101	0,01	0	0
К тканини листка	0,02	0	0,01

Таблиця 2. Сумарна концентрація загальних водорозчинних білків в екстрактах листових тканин махорки

Промотор	Середній показник та стандартне відхилення сумарної концентрації водорозчинних білків, мкг/мл
К GV3101	$546 \pm 2,0$
К тканини листка	$569 \pm 3,6$
D35S	$1921 \pm 2,0$
35S	$1643 \pm 2,0$
LHB1B1	$1076 \pm 2,65$
LHB1B2	$1372 \pm 3,6$
RbcS2B	$1556 \pm 2,0$
RbcS1B	$1120 \pm 4,0$

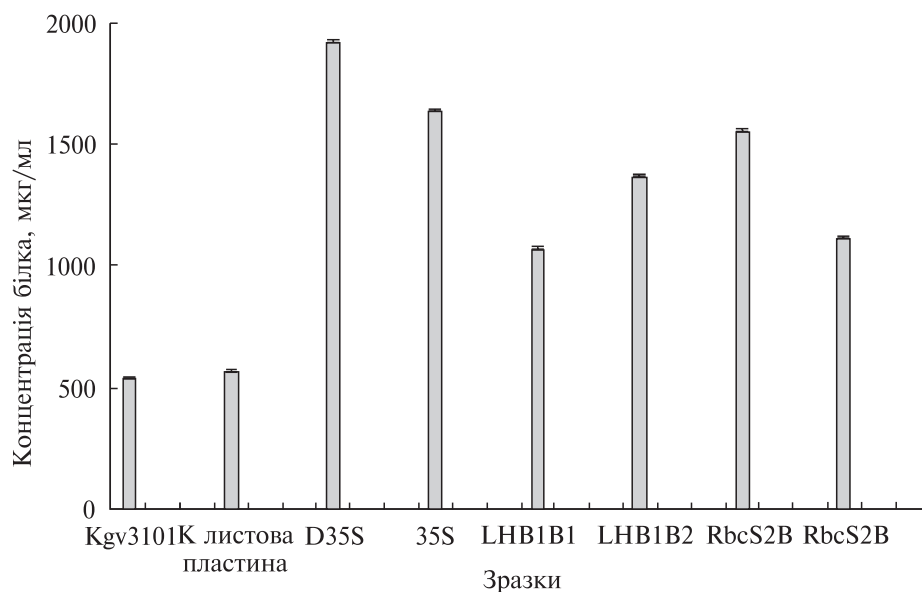


Рис. 4. Сумарна концентрація загальних водорозчинних білків в екстрактах листових тканин рослин махорки

трансгенного тютюну. Результати їх досліджень свідчать про однаковий рівень експресії гена *gus* в листках сої при використанні обох промоторів, а в коренях та пагонах рівень експресії гена *gus* був вищим в 3 та 5 разів відповідно при використанні промотору RbcS порівняно з 35S CaMV промотором [37].

Tanabe і співавт. порівнювали рівень експресії гена *gus* з використанням промотору гена RbcS1, виділеного з солодкої картоплі, та 35S CaMV промотору в трансгенних рослинах *Arabidopsis*. Результати цих досліджень показали, що рівні експресії гена *gus* при використанні обох промоторів істотно не відрізнялись [38]. Kushwash в своїй роботі також відзначив високий рівень експресії гена *gus* при використанні промотору гена RbcS2B, виділеного з *A. thaliana*, в різних тканинах рослин [39], а Dickinson і співавт. зафіксували транзійтну експресію гена люциферази (*luciferase*) з використанням промотору RbcS1B, виділеного з *A. thaliana*, в різних тканинах рослин отруйного плюща [40].

В наших дослідженнях рівень експресії гена *gfp* під контролем промоторів генів RbcS2B і RbcS1B за результатами спектрофлуориметричного аналізу складав $0,267 \pm 0,02$ та $0,131 \pm 0,013$ умовних одиниць, що в 3,9 та 8,1 разів нижче від рівня експресії гена *gfp* при використанні

промотору D35S CaMV відповідно. При цьому, сумарна концентрація загальних водорозчинних білків в екстрактах тканин махорки при використанні промоторів генів RbcS2B і RbcS1B дорівнювала 1556 ± 2 мкг/мл та 1119 ± 4 мкг/мл відповідно.

Таким чином, враховуючи, що махорка порівняно з іншими видами роду *Nicotiana* має великий потенціал для експресії гетерологічних білків, велику вегетативну біомасу, легко інфільтрується (як при вакуумній інфільтрації, так і за допомогою шприца), і при цьому, є невибагливою при вирощуванні, вона є потенційно перспективним хазяїном для експресії гетерологічних білків при транзійтній трансформації.

Система транзійтної експресії в рослинах *N. rustica* L. може бути використана не тільки для вивчення та порівняння ефективності роботи різних промоторів, але й інших регуляторних послідовностей.

В даній роботі була показана можливість використання рослин махорки (*N. rustica* L.) для транзійтної експресії репортерного гена *gfp* та накопичення рекомбінантного білка, а саме GFP. Вперше була вивчена робота шести різних промоторів вірусного та рослинного походження на прикладі експресії гена *gfp* в

листяних тканинах рослин махорки та проведено порівняльний аналіз їх рівня регуляції. Найвищий рівень експресії гена *gfp* спостерігали при використанні подвійного 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти – D35S CaMV, а найнижчий – при використанні промотору гена LHB1B1. Отримані результати дозволяють стверджувати, що D35S CaMV забезпечує в 1,7 рази вищу експресію гена *gfp* в рослинах махорки, ніж 35S CaMV промотор, а промотори генів RbcS1B та RbcS2B, що кодують малу субодиницю рибулозобісфосфаткарбоксілази (Rubisco) *A. thaliana* забезпечують нижчу експресію в 4,7 та 2,3 рази відповідно. Промотори генів LHB1B1 та LHB1B2 з *A. thaliana* забезпечують нижчі рівні експресії, а саме в 5,2 та 2,7 разів в порівнянні з D35S CaMV.

Дотримання етичних стандартів. Жодна тварина/людина не використовувалася в експериментах, які є основою цього дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів, фінансових чи інших.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

COMPARISON OF THE GFP GENE EXPRESSION LEVELS AFTER *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSIENT TRANSFORMATION OF *NICOTIANA RUSTICA* L. BY CONSTRUCTS WITH DIFFERENT PROMOTER SEQUENCES

O.I. Varchenko, M.V. Kuchuk,
M.F. Parii, Yu.V. Symonenko

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
NAS of Ukraine, Kyiv
All-Ukrainian Scientific Institute of Breeding, Kyiv
National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: okvarchenko@gmail.com

Promoters are key elements on the level of gene expression, so their selection is an important step in genetic engineering research. The reporter *gfp* gene, which encodes green fluorescent protein (GFP), was transiently expressed in the leaf tissues of the Aztec tobacco *Nicotiana rustica* L. Compared to other species of the *Nicotiana* genus, it has a large potential for the expression of heterologous proteins, a large vegetative

biomass, can be easily infiltrated, and is unpretentious in cultivation. Six genetic constructs were used with different promoter sequences: the 35S promoter of Cauliflower Mosaic Virus (35S CaMV), the double 35S promoter (D35S CaMV), promoters of the RbcS1B and RbcS2B genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) isolated from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., and promoters of the LHB1B1 and LHB1B2 genes from *A. thaliana* encoding chlorophyll a-b binding proteins. The *gfp* gene expression was detected visually, spectrofluorimetrically and by protein content (Bradford assay) on the 7th day after infiltration. The highest level of expression was obtained using the double 35S promoter (D35S CaMV) and the lowest – when the promoter of the LHB1B1 gene was used.

СРАВНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА GFP ПРИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНЗИЕНТНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МАХОРКИ *NICOTIANA RUSTICA* L. КОНСТРУКЦИЯМИ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОМОТОРНЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ

О.И. Варченко, Н.В. Кучук,
М.Ф. Парий, Ю.В. Симоненко

Промоторы – это ключевые элементы уровня экспрессии генов, поэтому их выбор является важным этапом в генно-инженерных исследованиях. Репортерный ген *gfp*, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP), транзистентно экспрессировали в листовых тканях махорки *Nicotiana rustica* L. По сравнению с другими видами рода *Nicotiana* она имеет большой потенциал для экспрессии гетерологичных белков, большую вегетативную биомассу, легко инфильтрируется, и при этом является неприхотливой при выращивании. В работе использовали шесть созданных нами генетических конструкций, которые отличались промоторными последовательностями: 35S промотор вируса мозаики цветной капусты – Cauliflower Mosaic Virus (35S CaMV), двойной 35S промотор (D35S CaMV), промоторы генов RbcS1B и RbcS2B, кодирующих малую субодиницу рибулозобисфосфаткарбоксілазы (*Rubisco*), выделенных из резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), и промоторы генов LHB1B1 и LHB1B2 с *A. thaliana*, кодирующих хлорофилл *a-b* связывающие белки. Экспрессию гена *gfp* детектировали на 7 день после инфильтрации визуальнo, спектрофлуориметрично и по белковому содержанию (метод Брэдфорда). Самый высокий уровень экспрессии наблюдали при использовании двойного 35S промотора (D35S CaMV), а самый низкий – при использовании промотора гена LHB1B1.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Blazeck, J., Alper, H., Systems metabolic engineering: Genome-scale models and beyond, *Biotechnol. J.*, 2010, vol. 5, no. 7, pp. 647–59. doi.org/10.1002/biot.200900247.
- Keasling, J.D., Manufacturing molecules through metabolic engineering, *Sci.* 2010, vol. 330, no. 6009, pp. 1355–8. doi: 10.1126/science.1193990.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Front. Microbiol.*, 2014, vol. 5, no. 172, pp. 1–17. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172.
- De Vooght, L., Caljon, G., Stijlemans, B., De Baetselier, P., Coosemans, M., and Van Den Abbeele, J., Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody® in *Sodalis glossinidius*, a bacterial symbiont of the tsetse fly, *Microb. Cell Factories*, 2012, vol. 1, no. 11, p. 1–11. doi.org/10.1186/1475-2859-11-23.
- Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, 2005, vol. 115, no. 2, pp. 113–28. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H., Micro RNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation, *Mol. Cell*, 2008, vol. 30, no. 4, pp. 460–71. doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001.
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S., and Gray, N.K., Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors, *Trends Biochem. Sci.*, 2003, vol. 28, no. 4, pp. 182–8. doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00051-3.
- Leppek, K., Das, R., and Barna, M., Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 2018, vol. 19, no. 3, pp. 158–74. doi: 10.1038/nrm.2017.103.
- Becker, J., Wittmann, C., Advanced biotechnology: Metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials and healthcare products, *Angewandte Chemie Int. Edition*, 2015, vol. 54, no. 11, pp. 3328–50. doi.org/10.1002/anie.201409033.
- Curran, K.A., Karim, A.S., Gupta, A. and Alper, H.S. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications, *Metabolic Eng.*, 2013, vol. 19, pp. 88–97. doi.org/10.1016/j.ymben.2013.07.001.
- Hernandez-García, C.M. Finer, J.J., Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements, *Plant Sci.*, 2014, vol. 217, pp. 109–19. doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P., and Yang, B., High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice, *Nature Biotechnol.*, 2012, vol. 30, no. 5, p. 390–2. doi: 10.1038/nbt.2199.
- Ndamukong, I., Abdallat, A.A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., and Gatz, C., SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1 2 transcription, *Plant J.*, 2007, vol. 50, no. 1, pp. 128–39. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03039.x.
- Kay, R., Chan, A.M.Y., Daly, M., and McPherson, J., Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes, *Sci.* 1987, vol. 236, no. 4806, pp. 1299–302. doi: 10.1126/science.236.4806.1299.
- Izumi, M., Tsunoda, H., Suzuki, Y., Makino, A., and Ishida, H., RBCS1A and RBCS3B, two major members within the *Arabidopsis* RBCS multigene family, function to yield sufficient Rubisco content for leaf photosynthetic capacity, *J. Exp. Bot.*, 2012, vol. 63, pp. 2159–70. doi.org/10.1093/jxb/err434.
- Blazeck, J., Alper, H.S., Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level, *Biotechnol. J.*, 2013, vol. 8, no. 1, pp. 46–58. doi.org/10.1002/biot.201200120.
- Zhang, X.H., Webb, J., Huang, Y.H., Lin, L., Tang, R.S., and Liu, A., Hybrid Rubisco of tomato large subunits and tobacco small subunits is functional in tobacco plants, *Plant Sci.*, 2011, vol. 180, no. 3, pp. 480–8. doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.001.
- Umate, P., Genome-wide analysis of the family of light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins in *Arabidopsis* and rice, *Plant Sign. Behav.*, 2010, vol. 5, no. 12, pp. 1537–42. doi.org/10.4161/psb.5.12.13410.
- Varchenko, O.I., Krasnyuk, B.M., Fedchunov, O.O., Zimina, O.V., Parii M.F., and Symonenko, Yu.V., Genetic constructs creating using Golden Gate method, *Fact. Exp. Evol. Organ.*, 2019, vol. 25, pp. 190–6. doi.org/10.7124/FEEO.v25.1163.
- Bertani, G., Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 1951, vol. 62, no. 3, pp. 293–300. PMID: PMC386127. PMID: 14888646. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386127/.
- Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., and Chen, Q., Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins, *JoVE*, 2013, vol. 77, e50521. pp. 1–9. doi: 10.3791/50521.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory,

- 1989, 1546 pp. <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.474251/page/n53/mode/2up>.
23. 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, vol. 72, pp. 248–54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 24. Ko, K., Koprowski, H., Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res.*, 2005, vol. 111, no. 1, pp. 93–100. doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.016
 25. Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., and Chen, Q., Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins, *JoVE*, 2013, vol. 77, e50521. doi: 10.3791/50521.
 26. Shamloul, M., Trusa, J., Mett, V., and Yusibov, V., Optimization and utilization of *Agrobacterium*-mediated transient protein production in *Nicotiana*, *JoVE*, 2014, vol. 86, e51204. doi: 10.3791/51204.
 27. Conley, A.J., Zhu, H., Le, L.C., Jevnikar, A.M., Lee, B.H., Brandle, J.E., and Menassa, R., Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis, *Plant Biotechnol. J.*, 2011, vol. 9, no. 4, pp. 434–44. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00563.x.
 28. Wally, O., Jayaraj, J., and Punja, Z.K., Comparative expression of β -glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues, *Plant Cell Rep.*, 2008, vol. 27, no. 2, pp. 279–87. doi: 10.1007/s00299-007-0461-1.
 29. Anuar, M.R., Ismail, I., and Zainal, Z., Expression analysis of the 35S CaMV promoter and its derivatives in transgenic hairy root cultures of cucumber (*Cucumis sativus*) generated by *Agrobacterium rhizogenes* infection, *Afr. J. Biotechnol.*, 2011, vol. 10, no. 42, pp. 8236–44. doi: 10.5897/AJB11.130.
 30. Patro, S., Kumar, D., Ranjan, R., Maiti, I.B., and Dey, N., The development of efficient plant promoters for transgene expression employing plant virus promoters, *Mol. Plant*, 2012, vol. 5, no. 4, pp. 941–4. doi: 10.1093/mp/sss028.
 31. Li, Z., Jayasankar, S., and Gray, D.J., Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*), *Plant Sci.*, 2001, vol. 160, no. 5, pp. 877–87. doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00336-3.
 32. Elliot, A.R., Campbell, J.A., Dugdale, B., Brettell, R.I.S., and Grof, C.P.L., Green-fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells, *Plant Cell Rep.*, 1999, vol. 18, pp. 707–14. doi.org/10.1007/s002990050647.
 33. Blumenthal, A., Kuznetsova, L., Edelbaum, O., Raskin, V., Levy, M., and Sela, I., Measurement of green fluorescent protein in plants: quantification, correlation to expression, rapid screening and differential gene expression, *Plant Sci.*, 1999, vol. 142, no. 1, pp. 93–9. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00249-0.
 34. Richards, H.A., Halfhill, M.D., Millwood, R.J., and Stewart, C.N.Jr., Quantitative GFP fluorescence as an indicator of recombinant protein synthesis in transgenic plants, *Plant Cell Rep.*, 2003, vol. 22, no. 2, pp. 117–21. doi: 10.1007/s00299-003-0638-1.
 35. Zhou, X., Carranco, R., Vitha, S., and Hall, T.C., The dark side of green fluorescent protein, *New Phytol.*, 2005, vol. 168, no. 2, pp. 313–22. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01489.x.
 36. Kapulnik, Y., Kahana, A., Bar-Akiva, A., Ben D.V.R., Winger, S., and Ginzberg, I., *U.S. Patent No. 6,844,484*, 2005, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 37. Cui, X.Y., Chen, Z.Y., Wu, L., Liu, X.Q., Dong, Y.Y., Wang, F.W. and Li, H.Y. RbcS SRS4 promoter from *Glycine max* and its expression activity in transgenic tobacco, *Genet. Mol. Res.*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 7395–405. doi.org/10.4238/2015.July.3.15.
 38. Tanabe, N., Tamoi, M., and Shigeoka, S., The sweet potato RbcS gene (IbRbcS1) promoter confers high-level and green tissue-specific expression of the GUS reporter gene in transgenic *Arabidopsis*, *Gene*, 2015, vol. 567, no. 2, pp. 244–50. doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.006.
 39. Kushwah, N.S., Isolation, cloning and characterization of promoter of rubisco small subunit 2B (rbc-S2B) gene of *Arabidopsis thaliana*, *Innovat. Farm.*, 2016, vol. 1, no. 4, pp. 119–28. <http://www.innovativefarming.in/index.php/innofarm/article/view/150>.
 40. Dickinson, C.C., Weisberg, A.J., and Jelesko, J.G., Transient heterologous gene expression methods for poison ivy leaf and cotyledon tissues, *Hort Sci.*, 2018, vol. 53, no. 2, pp. 242–6. doi.org/10.21273/HORTSCI12421-17.

Надійшла в редакцію 19.06.20
Після доопрацювання 12.07.20
Прийнята до друку 18.11.20