

Создание транспозон-ассоциированной репортерной системы для изучения мобилома растений

Е.Д. Камараули^{1*}, И.В. Киров^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (МФТИ), Долгопрудный, Россия

² ФГБНУ ВНИИСБ, Москва, Россия

* kamarauli.ed@phystech.edu

Цель: Создание репортерной системы на основе ретротранспозона *Onsen* для растения *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы: Растения *A. thaliana* Col-0 (дикий тип) выращивались в почве в течение месяца при температуре 22 °C и условиях длинного дня (16 ч света/8 ч темноты). Выделение геномной ДНК проводилось из 200 нг молодых листьев методом СТАВ. Амплификация последовательности *Onsen* проводилась с геномной ДНК с помощью набора БиоМастер LR HS-ПЦР (2х) (Биолабмикс, Россия). Клонирование *Onsen* производилось в экспрессионный вектор pGD121 с помощью технологии TEDA (T5 exonuclease DNA assembly). Полученные плазмиды были трансформированы в Агробактерии (*Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101). Проверка последовательности каждой полученной плазмиды проводилась нанопоровым секвенированием.

Результаты: Создание репортерной системы включает в себя разработку и клонирование генетической конструкции, содержащей последовательность ретротранспозона *Onsen*. Для создания генетической конструкции последовательность самой активной копии ретротранспозона (AT1TE12295) была разделена на 2 фрагмента, которые были амплифицированы с геномной ДНК *A. thaliana*. Фрагмент 1 содержал последовательность 5'LTR и открытую рамку считывания, фрагмент 2 содержал 3'LTR, а также участок клонирования, содержащий несколько сайтов рестрикции для внедрения различных репортерных генов в последовательность ретротранспозона в дальнейшем. Помимо этого, оба фрагмента имели 15–20 нуклеотидных гомологичных участков, необходимые для клонирования в плазмидный вектор. В данной работе использован экспрессионный вектор pGD121, из которого предварительно был вырезан 35S промотор и Tnos терминатор, в виду того, что ретротранспозон *Onsen* содержит собственные теплочувствительные элементы, реагирующие на повышение температуры и запускающие процесс транскрипции в следствие воздействия высоких температур на растение. Сборка линейаризованного вектора и обоих амплифицированных фрагментов *Onsen* проводилась с помощью метода TEDA – типа клонирования, при котором происходит сборка ДНК фрагментов по гомологичным фрагментам – такой способ позволяет клонировать несколько фрагментов в одной пробирке. Далее в полученную конструкцию pGD121-ONSEN была заклонирована последовательность интрона, входящего в ген *nprb1* и способного вырезаться во время альтернативного сплайсинга, что сигнализирует о начале жизненного цикла ретротранспозона и, соответственно, транспозиции. Последовательность полученных плазмид была подтверждена с помощью нанопорового секвенирования и трансформирована в Агробактерии методом электропорации.

Выводы: Полученная генетическая конструкция на основе ретротранспозона *Onsen* является начальным этапом в создании репортерной системы, которая позволит лучше понять биологию мобильных элементов: процессы их активации, транспозиции и наследования. В дальнейшем в базовую конструкцию будут заклонированы различные репортерные гены, которые позволят легко визуализировать жизненный цикл мобильных элементов.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке программы «Приоритет 2030» (МФТИ, Физтех).