

Увеличение эффективности трансгенных растений-продуцентов путем использования двойного терминатора в экспрессионной кассете

О.В. Битюкова*, В.А. Орлова, М.С. Бурлаковский, В.Д. Тимонин, Л.А. Лутова, М.В. Падкина

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* 79292693255o@gmail.com

Цель: На сегодняшний день одним из основных недостатков растений как продуцентов рекомбинантных белков остается низкий и нестабильный уровень синтеза целевого белка. Существуют способы увеличения эффективности экспрессии трансгена, среди которых – использование тандема терминаторов. Комбинация терминаторов T35S-TNOS увеличивает экспрессию целевого гена в 18,4 раза по сравнению с использованием одного терминатора TNOS, что связано со снижением вероятности сквозной транскрипции. Конечной целью данной работы является создание трансгенных растений моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus* Hoffm.), продуцирующих бычий гамма-интерферон и пригодных к применению в ветеринарии в качестве иммуностимулирующей подкормки, позволяющей уменьшить количество используемых антибиотиков.

Материалы и методы: Первым этапом стало создание плазмиды – компонента системы Gateway, несущей тандем терминаторов T35S и TNOS. Амплификацию проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion и праймеров с адаптерами, несущими сайт рестрикции EcoRI (для соединения продуктов путем рестрикции-лигирования) и attB-сайты (для вставки получившегося конструкта в плазмиду pDONR P2R-P3 в ходе BP-клонажной реакции). В дальнейшем методом Multi-site Gateway создали целевой вектор pK4 3GW::p35S::sIFNGdel::T35S::TNOS для экспрессии в растениях гена бычьего интерферона-гамма (*sIFNGdel*), модифицированного для устойчивости к протеолитической деградации. Вектор клонировали в клетках *Escherichia coli* штамма DH10β и в дальнейшем в клетках *Agrobacterium rhizogenes* штамма Arqua и *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL1. Работоспособность вектора проверяли на культуре «бородатых корней» моркови сорта Нантская-4, анализ экспрессии трансгена проводили методом ОТ-ПЦР-РВ. Полноценные трансгенные растения получали методом агробактериальной трансформации каллусов, выращенных из зародышей моркови. Растения проверяли методом ПЦР на присутствие трансгена.

Результаты: В процессе исследования создана плазмида – компонент системы Gateway, которая содержит тандем терминаторов T35S-TNOS. С ее помощью получили вектор, содержащий промотор p35S, модифицированный (укороченный) ген бычьего гамма-интерферона (из коллекции лаборатории) и тандем терминаторов T35S-TNOS. Второй вектор, несущий аналогичный ген с одинарным терминатором T35S, также взят из коллекции лаборатории и использовался в качестве контроля. В образцах «бородатых корней» моркови подтверждена экспрессия трансгена и тем самым функциональность двух использованных плазмид; на данном этапе не обнаружено значимых различий между конструкциями с одним и двумя терминаторами. В результате агробактериальной трансформации было получено 45 растений, 44 из которых дали положительный результат в ходе ПЦР-проверки (10 растений содержат вставку с одним терминатором – контрольная группа, 34 – с двумя терминаторами – экспериментальная группа). На данный момент проведена холодовая обработка корнеплодов для стимуляции цветения моркови и в дальнейшем получения удвоенных гаплоидов. Также следующим шагом будет оценка уровня экспрессии трансгена на уровне РНК методом ОТ-ПЦР-РВ, и на уровне белка методом вестерн-блот.

Выводы: В результате проведенного исследования создан вектор для агробактериальной трансформации, содержащий укороченный ген гамма-интерферона быка под контролем промотора p35S и тандема терминаторов T35S-TNOS для высокоэффективной экспрессии. С помощью данной конструкции и аналогичной из коллекции лаборатории (с одним терминатором T35S, для сравнения) получены 44 трансгенных растения моркови. Дальнейшие планы включают селекционные мероприятия для создания гомозиготной линии растений-продуцентов гамма-интерферона и сравнение эффективности экспрессии трансгена с одним и двумя терминаторами на уровне РНК (ОТ_ПЦР_РВ) и белка (вестерн-блот).

Финансирование: Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на создание научного центра мирового класса «Агротехнологии будущего» (соглашение № 075-15-2022-322 от 22.04.2022).