



УДК 57.084.1; 57.085.1

Генетическая трансформация каллусов томата биобаллистическим методом с использованием гена GUS, кодирующего синтез β -глюкуронидазы

А. С. Столбиков^{1,2}, Р. К. Саляев¹, Н. И. Рекославская¹,
А. В. Третьякова^{1,2}

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: cell@sifibr.irk.ru

Аннотация. Сделана попытка биобаллистической трансформации каллусов томата с целью изучения возможности использования данного метода для получения растений с более высоким содержанием целевого белка. Данная работа является первым этапом, позволяющим с помощью гена GUS оценить пригодность применяемых манипуляций для получения в дальнейшем растений, трансформированных целевым геном с пластидной адресацией. Было получено более 2 тыс. каллусов и проведено 6 серий биобаллистических экспериментов. Трансформированные каллусы растений томата исследовались с помощью флуоресцентного и гистохимического методов, которые показали высокий процент успешной генетической трансформации. Полученные результаты свидетельствуют о том, что биобаллистическая трансформация каллусов может быть эффективно использована для дальнейшей работы с целевым геном, имеющим пластидную адресацию.

Ключевые слова: биобаллистическая трансформация, ген GUS, каллусы.

Введение

Создание вакцин на основе трансгенных растений в последнее время получает всё большее распространение. Они обладают некоторыми преимуществами перед стандартными вакцинными препаратами: во-первых, более дешёвы и относительно легки в получении, что позволит распространять их в страны с разным уровнем экономического благополучия; во-вторых, применение оральных вакцин сводит к минимуму риск возникновения аллергических реакций, так как они не содержат химических соединений, используемых в качестве адъювантов, консервантов, стабилизаторов и чужеродных белков животного или дрожжевого происхождения, а также вспомогательных препаратов, при помощи которых ослабляют или инактивируют возбудителя (неомицин, гентамицин, полимиксин). Растительные вакцины являются более безопасными, поскольку не содержат живых ослабленных патогенных организмов. К тому же, в отличие от инъекционных, процесс применения оральных вакцин не вызывает болевых ощущений, что

немаловажно при вакцинации детей. Инъекционные вакцины индуцируют системный иммунитет и не способны вызвать мукозный иммунный ответ, в то время как иммунизация слизистой часто приводит к стимуляции не только мукозного, но и системного иммунитета.

Особое внимание при создании кандидатных растительных вакцин необходимо уделять повышению количества антигенных (целевых) белков на единицу ОРБ (общего растворимого белка).

Согласно литературным данным практическое применение вакцины на основе трансгенных растений экономически целесообразно при содержании целевого антигенного белка не менее 1 % от ОРБ [7]. Опубликованные научные исследования свидетельствуют о том, что при пластидной трансформации удаётся получать достаточно высокий уровень целевых белков [5; 6; 8–10]. Однако в ряде случаев методики пластидной трансформации дают низкий выход трансгенных растений и являются крайне трудоёмкими. Поэтому для получения растений, которые продуцируют целевые белки не только в листьях, но и в плодах и других тканях, имеющих пластиды, по нашему мнению, необходимо проводить биобаллистическую трансформацию каллусов, зародышей или меристематических зон эксплантов. Учитывая это, была осуществлена попытка биобаллистической трансформации каллусов растений томата репортерным геном GUS. Целью данной работы было изучить особенности и эффективность генетической трансформации каллусов растений томата с применением биобаллистического метода.

Материалы и методы

Объектом для нашего исследования было выбрано растение томата (*Lycopersicon esculentum*) сорта Вентура, поскольку томат достаточно успешно культивируется в условиях *in vitro*, обладает высокой способностью к каллусообразованию и возникновению морфогенных структур. В качестве целевого гена, который позволил бы дать оценку эффективности используемого метода, был выбран репортерный ген GUS, кодирующий синтез β-глюкуронидазы. Целевой ген находился в составе векторной конструкции pBI121, клонируемой в *E. coli* [4]. Бактериальную культуру выращивали в течение суток в стеклянных колбах на качалке при 200–300 rpm в жидкой среде YEB с добавлением канамицина (50 мг/л).

Зародыши растений извлекали путём препарирования стерильным лезвием или скальпелем набухших семян томата. Культивацию зародышей осуществляли на питательной среде (MS + кинетин, индолилуксусная кислота) в течение 1–3 недель вплоть до образования каллусов.

Полученные каллусы помещали на среду с повышенной осмотической силой (PAGAR (parep + agar), представляющей собой диск фильтровальной бумаги, помещённый на дно стерильной чашки Петри, залитый тонким слоем среды следующего состава: 1/2 MS, 0,125 М маннитола, 0,125 М сорбитола, 3 % сахарозы).

Генетическую трансформацию проводили в стерильных условиях посредством использования пневматической генной пушки конструкции Са-

ляева [1; 2]. В качестве «микроснарядов» использовали вольфрамовый порошок М17 (Bio-Rad) со средним диаметром 1,1–1,2 мкм. Навеску вольфрамовых частиц (6 мг) подвергали комплексной стерилизации: сначала автоклавировали, затем в течение 15 мин выдерживали в 96 %-ном этаноле, после этого трижды промывали стерильной бидистиллированной водой и ресуспендировали в 50 мкл 25%-ного стерильного глицерола. Препаративное выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса с очисткой полиэтиленгликолем 6000 [3]. Полученную плазмидную ДНК после выделения осаждали на микрочастицы путём добавления к 25 мкл суспензии вольфрамовых частиц (3 мг) 5 мкл плазмидной ДНК (5 мкг), 25 мкл 2,5 М стерильного CaCl_2 и 10 мкл 0,1 М стерильного спермидина. После отстаивания и охлаждения (в течение 1 мин на льду) суспензию центрифугировали на настольной микроцентрифуге «Type-320» (Польша) в течение 30 с, затем супернатант удаляли микропипеткой, а осадок микрочастиц ресуспендировали в 50 мкл 100%-ного этанола. Перед нанесением ДНК-вольфрамой суспензии фронтальную поверхность тефлоновых макроснарядов обезжиривали 96 %-ным этанолом. Суспензию объёмом 2 мкл наносили в углубление на фронтальной поверхности тефлоновых макроснарядов, подсушивали в течение 10–15 с и оберегали от повторного увлажнения. Генетическую трансформацию производили на расстоянии 4–5 см от диафрагмы пушки до мишени. За один эксперимент производили 15–20 «выстрелов», в ходе которых обстреливали 150–200 каллусов. После трансформации для уменьшения ущерба, нанесённого клеткам «микроснарядами», контрольные и опытные образцы оставляли на среде P₀AGAR на 1–2 ч. После P₀AGAR с каллусами переносили на среду с низкой осмотической концентрацией и оставляли в темноте на 2–3 сут. Затем контрольные и трансформированные каллусы проращивали в сосудах Фитакон и Мажента на питательной среде. Была проведена серия экспериментов по подбору питательной среды для культивирования каллусов, полученных из незрелых зародышей растений томата. В итоге оптимальным субстратом была определена среда Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением 1 мг/л кинетина и 1 мг/л индолилуксусной кислоты, 3 % сахарозы.

Для молекулярно-биохимического подтверждения инсерции и экспрессии целевого гена применяли флуоресцентный метод с использованием субстрата 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронида. Измерения флуоресценции экстрактов каллусов проводили на 2-е, 6-е, 10-е и 27-е сут. после обстрела на флюориметре VersaFluor (Bio-rad). Однако этот способ не позволил нам определить локализацию трансформированной области. Более чёткую картину позволил выявить гистохимический метод с использованием субстрата X-Gluc (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-β-D-глюкуронид). X-Gluc готовили в фосфатном буфере (50 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ ЭДТА, 0,1 % Тритон X-100, 0,1 % SDS, 10 мМ меркаптоэтанол, pH 7,0) в концентрации 0,5 мг/мл. Каллусы помещали в раствор X-Gluc таким образом, чтобы он полностью покрывал ткани, и инкубировали 24–48 ч. После реакции с X-Gluc в области локализации фермента образовывалась окраска голубого цвета. При оценке

эффективности биобаллистической трансформации гистохимическим методом использовали каллусы с разным временем инкубации, в том числе те, у которых в зонах дифференциации образовались зачатки стеблей и корней.

Результаты и обсуждение

Было получено более 2 тыс. каллусов и проведено 6 серий биобаллистических экспериментов. Часть каллусов после генетической трансформации исследовали флуоресцентным методом с использованием субстрата 4-метилумбеллиферил- β -D-глюкуронида, который показал достоверное превышение как общего, так и относительного уровня флуоресценции над контрольными образцами, что явилось свидетельством успешной генетической трансформации каллусов (рис. 1).

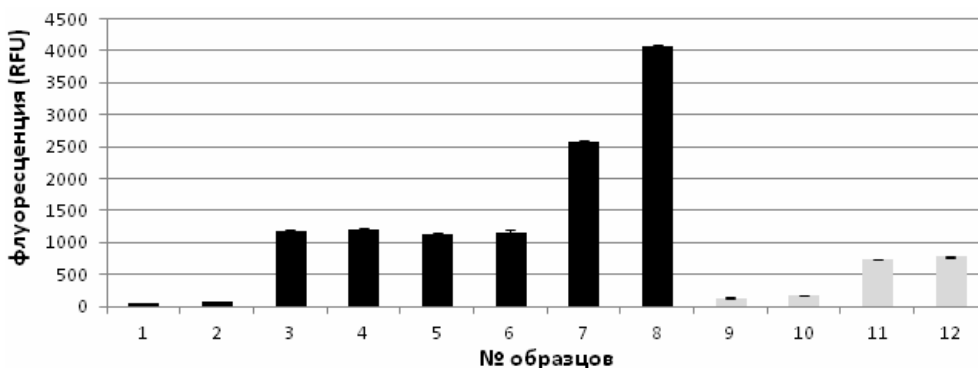


Рис. 1. Уровень флуоресценции образцов каллусов томата *L. esculentum* сорта Вентура после биобаллистической трансформации: 1–2 – опытные образцы с ингибированием в нулевое время; 3–8 – опытные образцы; 9–10 – контроль, ингибированный в нулевое время; 11–12 – контрольные образцы

Гистохимический метод с использованием субстрата X-Gluc позволил определить чёткую локализацию трансформированных тканей с выявлением областей, в которых произошла генетическая модификация клеток каллусов. Убедительным подтверждением эффективности используемого метода генетической модификации каллусов стала наблюдаемая примерно у 80 % опытных каллусов экспрессия целевого гена GUS, которая проявлялась в виде голубой окраски при инкубации каллусов в растворе, содержащем специфический субстрат. Следует также отметить тот факт, что голубое окрашивание наблюдали в морфогенных зонах каллусов и в зачатках листьев и корешков, образовавшихся из них (рис. 2, А–С).

Заключение

Использование репортерного гена позволило убедиться, что данный метод позволяет успешно трансформировать каллусы. Полученные результаты указывают на довольно высокий процент генетической трансформации каллусов растений томата, что свидетельствует об эффективности использованных подходов и методов. Кроме того, присутствие продукта экспрессии

гена GUS в меристематических зонах, а также в стеблях, листьях и корешках, образовавшихся из трансформированных каллусов, даёт надежду на успешную генетическую модификацию большого количества пластид, что должно увеличить выход целевого белка. Эти результаты показали перспективность данного метода для дальнейшей работы с целевым геном, имеющим пластидную адресацию, что должно дополнительно повысить эффективность трансформации.

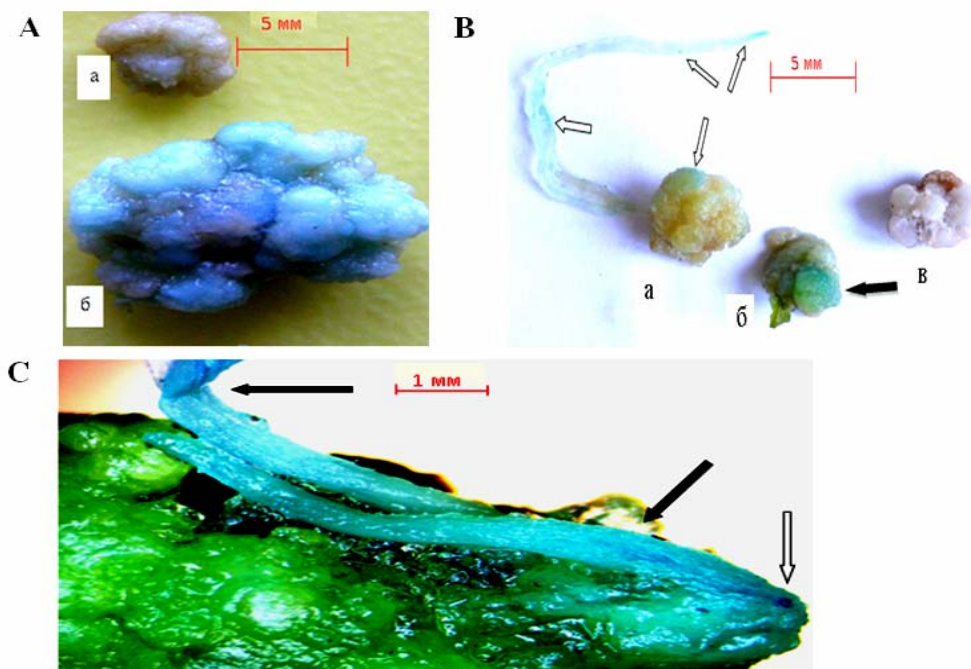


Рис. 2. Каллусы томата *L. esculentum* сорта Вентура, инкубированные разные сроки после проведения биобаллистической трансформации. А – каллусы через 6 дней после трансформации: а – контрольный каллус; б – каллус после трансформации. В – каллусы через 14 дней после трансформации: а – трансформированный каллус с образовавшимся корешком, имеющим зоны, окрашенные в голубой цвет (стрелки); б – трансформированный каллус, в котором меристематическая зона окрашена в голубой цвет (стрелка чёрного цвета); в – контрольный каллус. С – каллус через 14 дней после трансформации при увеличении 20×. Стрелками указан окрашенный в голубой цвет проросток с зачатками листьев, образовавшийся из генетически трансформированного участка каллуса (стрелка белого цвета)

Список литературы

1. Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулёв. – Новосибирск : Сиб. ун-т, 2003. – 479 с.
2. Получение трансгенной озимой пшеницы введением гена UGT биобаллистическим методом / Р. К. Салаяев [и др.] // Изучение генома и генетическая трансформация растений : материалы Всерос. симп. (23–27 авг. 1999, г. Иркутск). – Новосибирск : Наука, 2001. – С. 123–131.

3. Рекославская Н. И. Основы лабораторной работы с нуклеиновыми кислотами / Н. И. Рекославская, Р. К. Салыев. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 2012. – 186 с.
4. Complete sequence of binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants / P. Chen [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2003. – Vol. 11, N 4. – P. 287–293.
5. Dresen I. Heat-stable oral-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection / I. Dresen, G. Hamri, M. Fussenegger // *J. of Biotechnology*. – 2010. – Vol. 145, N 3. – P. 273–280.
6. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic / M. Oey [et al.] // *The Plant J*. – 2009. – Vol. 57, N 3. – P. 436–445.
7. Expression of HIV-I antigens in plants as potential subunit vaccines / A. Meyers [et al.] // *BMC Biotechnology*. – 2008. – Vol. 8:53. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/53>.
8. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic / A. Fernandes-San Millan [et al.] // *Plant Biotechnology J*. – 2008. – Vol. 6, N 5. – P. 427–441.
9. Lossl A. Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes / A. Lossl, M. Waheed // *Plant Biotechnology J*. – 2011. – Vol. 9, N 5. – P. 527–539.
10. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression / T. Ruhlman [et al.] // *Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 152. – P. 2088–2104.

Genetic Transformation of Tomato Calluses by the Bioballistic Method with the Use of GUS gene Encoding Synthesis of β -glucuronidase

A. S. Stolbikov^{1,2}, R. K. Salyaev¹, N. I. Rekoslavskaya¹,
A.V. Tretyakova^{1,2}

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

² *Irkutsk State University, Irkutsk*

Abstract. The present paper describes an attempt of bioballistic transformations of tomato calluses to the end of assessment of the potentialities of this method application for the purpose of obtaining plants having some larger content of the target protein. The work initiated represents the first stage, which presumes the application of GUS gene in the assessment of the manipulations applied to the end of obtaining the plants transformed with the use of the target gene with plastid addressing. More than 2 000 calluses have been received and 6 series of bioballistic experiments are made. The transformed calluses of tomato plants were investigated by means of fluorescent and histochemical methods which have shown high percent of successful genetic transformation. The received results demonstrate that bioballistic transformation of calluses can be effectively used for further work with the target gene having plastid addressing.

Keywords: bioballistic transformation, GUS, calluses.

Столбиков Алексей Сергеевич
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59
факс (3952) 51-07-54
инженер
Иркутский государственный университет
664003, Иркутск, ул. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: valkir5@yandex.ru

Салаяев Рюрик Константинович
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН, советник РАН
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59
факс (3952) 51-07-54
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Рекославская Наталья Игоревна
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59
факс (3952) 51-07-54
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Третьякова Анастасия Валерьевна
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59
факс (3952) 51-07-54
доцент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: anastasiya_chepi@mail.ru

Stolbikov Aleksey Sergeevich
Candidate of Science (Biology),
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel.: (3952) 42-46-59
fax (3952) 51-07-54
Engineer
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: valkir5@yandex.ru

Salyaev Ryurik Konstantinovich
Corresponding Member for RAS, Advisor
for RAS, Doctor of Science (Biology)
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel.: (3952) 42-46-59
fax (3952) 51-07-54
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Rekoslavskaya Nataliya Igorevna
Doctor of Science (Biology),
Principal Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel.: (3952) 42-46-59
fax (3952) 51-07-54
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Tretyakova Anastasiya Valeryevna
Candidate of Science (Biology),
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-46-59
fax (3952) 51-07-54
Associate Professor
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail anastasiya_chepi@mail.ru