

Д.А. ЕРЕЖЕПОВ¹, К.К. БОГУСПАЕВ¹, Б.К. ИСКАКОВ², Э. ХЕБЕРЛЕ-БОРС³

ПОЛУЧЕНИЕ КОНСТРУКЦИЙ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ КОНТРОЛИРУЕМОЕ УСИЛЕНИЕ ГЕНОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

(¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, НИИ проблем биологии и биотехнологии, ²Институт молекулярной биологии им. М.А. Айтхожина МОН РК, ³Венский университет, Австрия)

В статье приводятся результаты по получению конструкций, содержащих репортерный ген β -глюкуронидазы (*GUS*), ген целлюлазы 7A из гриба *Lentinula edodes* (*Shiitake*) и энхансерные элементы для последующей трансформации в растения *Arabidopsis thaliana*. Новые подходы для усиления экспрессии генов целлюлазы, способных к переработке растительной биомассы (отходы с/х производства, таких как солома злаков, опилки и т.д.) до простых сахаров, позволят создать в ближайшее время экологически безопасные технологии получения биоэтанола.

Компьютерный анализ показал, что мРНК стрессовых белков (в условиях гипертермии или гипоксии) таких как белки теплового шока (*HSP*) или ген алкогольдегидрогеназы (*Adh*), транслируются намного эффективнее, чем при обычных физиологических условиях. Этим они обязаны энхансерным участкам, входящим в состав их лидерных последовательностей /1/. В дополнение к этому, экспрессия генов активируется только при стрессовых условиях в виду наличия регуляторных областей в участке промотора (*HSE* или *ARE*) /2, 3/. Учитывая эти особенности конструкций в настоящее время, все больше расширяется поле их практического применения. Одним из направлений является получение трансгенных растений с встроенными целлюлазными генами для использования их в производстве биоэтанола.

На сегодня самым экономичным способом получения этанола из растительного сырья считается одновременный ферментативный гидролиз целлюлозы и гемицеллюлозы с последующей ферментацией получаемых свободных сахаров до этанола. В настоящее время все чаще предлагается новая технология экспрессии генов целлюлазы, выделенных из чистых штаммов гриба *Lentinula edodes* (более известны как грибы *Shiitake*), способных к переработке растительной биомассы (отходы с/х производства, таких как солома злаков, опилки и т.д.) до простых сахаров. Полученные сахара в дальнейшем используются как сырье для промышленного получения биоэтанола. Сегодня в ведущих компаниях мира рассматриваются возможности, и проводятся эксперименты по получению трансгенных растений, способных при определенных условиях (повышенные температуры до 37°C) после скашивания и укладки в емкости, запускать синтез ферментов (целлюлаз). В результате работы встроенных генов, ферменты расщепляют целлюлозу до свободных сахаров с последующим сбраживанием до этанола /4/.

Целью настоящих исследований является создание модельных конструкций, обеспечивающих контролируемый синтез фермента целлюлазы 7A из гриба *Lentinula edodes* (*Shiitake*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования послужили синтетические трансляционные энхансеры, минимальный 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты, элемент теплового шока, репортерный ген β -глюкуронидазы (*GUS*) и ген фермента целлюлазы 7A из гриба *Lentinula*

edodes. Конструкции, были созданы путем вставки в плазмиду pCAMBIA 2300 кассеты, содержащей элемент теплового шока из плазмиды pSGH2 и минимального 35S-промотора (-60) вируса мозаики цветной капусты по сайтам рестрикции *HindIII* и *NcoI*. Так же по сайтам рестрикции *NdeI* и *EcoRI* в плазмиду был добавлен терминатор нопаин синтазы (NOS-terminator), ответственный за сигнал полиаденилирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Большое внимание в течении 30 последних лет уделено изучению потенциала термофильных бактерий типа *Clostridium thermocellum* и *Clostridium thermosaccharoliticum*, которые продуцируют свои активные целлюлазы и гемицеллюлозы для переработки целлюлозы при высоких до 60⁰С температурах. Однако целлюлазные системы этих бактерий имеют достаточно сложный механизм ферментации и поэтому в настоящее время говорить об использовании этих систем в промышленном производстве биоэтанола преждевременно. Наиболее отработанными сегодня являются системы (конструкции) переработки целлюлозы, в которых используются гены целлюлолитических ферментов, выделенные из грибов в основном из штамма грибов *Lentinula edodes* (Shiitake) и *Trichoderma reesei* /4/.

К настоящему времени установлено, что фермент, известный как “cellulase” действительно является комплексом ферментов (целлюлозная ферментная система), в который входит три основных компонента для переработки нативной целлюлозы.

- Эндоглюканазы (endo-β-glucanase (EC 3.2.1.4) – случайные (не целевые) действия на растворимые и полисахаридные цепи.
- Экзоглюканазы (exo-β-glucanase (EC 3.2.1.91) - включают целлобиогидролазы (cellobiohydrolases), которые отщепляют целлобиозу или глюкозу от концов целлюлозной цепочки.
- В-глюкозидазы - (β-glucosidase (EC 3.2.1.21), которые освобождают D-глюкозу от димеров целлобиозы и экзоглюкозидазы (exoglucosidases), которые предпочтительно гидролизуют растворимые целлодекстрины.

Как показала практика, одна из активных целлюлозных ферментных систем содержится в штаммах гриба *Lentinula edodes* (Shiitake). Это экономически важная группа грибов, которая издавна используется в пище и в медицине. Традиционно грибы выращивают на свежих обрезках древесины. Грибы используют в качестве питательных веществ целлюлозу и гемицеллюлозу, извлекая их из гниющей древесины. Таким образом, разнообразие ферментов, продуцируемых грибами, может быть успешно использовано для переработки биомассы с последующим получением биоэтанола. На сегодня уже клонированы 2 целлюлазных гена из штамма этого гриба (*cel 7A* и *cel 6B*). Описана экспрессия этих генов для различных источников углерода и продемонстрировано, что оба гена активизируются в присутствии кристаллической целлюлозы /4/.

Для обеспечения контролируемого синтеза нам необходим был минимальный 35S-промотор, который сам по себе не может обеспечивать экспрессию гена, перед которым он находится. Для экспрессии ему необходим некий помощник (helper). В качестве такого помощника нами была выбрана кассета плазмиды pSGH2, содержащая восьмикратный бинаправленный повтор области промотора теплового шока (8xHSE). По обеим сторонам этого элемента находится TATA боксы, перед элементом «8xHSE» находится промоторы T7 и Sp6 /3/. В данную кассету по сайтам рестрикции ферментов *BamHI* и *Sall* был клонирован минимальный 35S-промотор.

В связи с этим в наших экспериментах были созданы следующие конструкции:

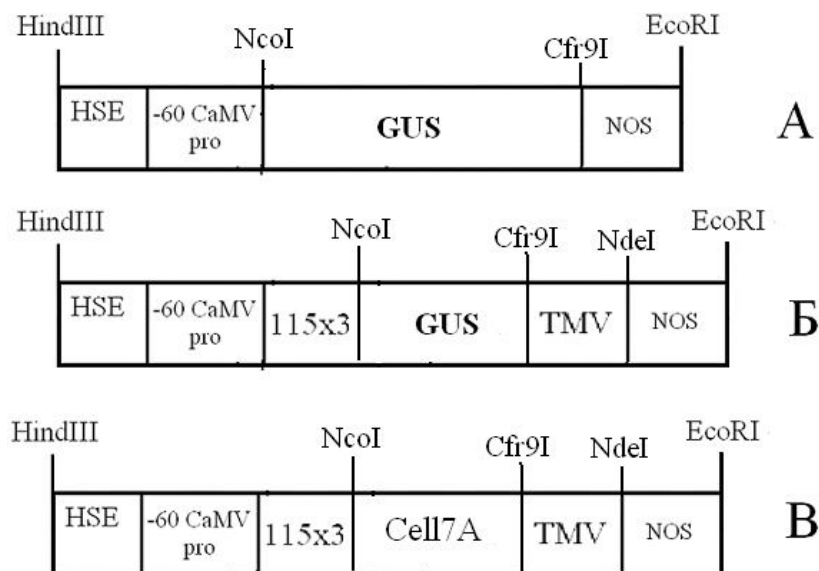
Первая конструкция, (контроль) - HSE-35S_{min}-GUS-NOS-pCAMBIA, не содержащая никаких трансляционных энхансерных последовательностей, была получена путем вставки в пустую плазмиду pCAMBIA, кассеты с элементом теплового шока и минимального 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, репортерного гена, кодирующего фермент β-

глюкуронидазу (*GUS*) и терминатор нопаин синтазы (*NOS-terminator*), ответственного за сигнал полиаденилирования (элемент мРНК растений, защищающий от рибонуклеаз и проявляющий некий энхансерный эффект /5/).

Вторая конструкция - *HSE-35Smin-115x3-GUS-TMV-NOS-pCAMBIA* была ранее получена с помощью вставки в плазмиду *pl-GUS* по рестрикционным сайтам *HindIII* и *NcoI* ДНК фрагмента, который содержит трехкратный повтор 10 нуклеотидной последовательности повторяющий внутренний район 18S рРНК растений с 1115 по 1124 нуклеотид (последовательность *ARC-1* /6/). Затем по сайтам рестрикции *BamHI* и *NdeI* в 3'-конец была вставлена 3'-нетранслируемую последовательность вируса табачной мозаики (*TMV*). Для приближения мРНК к растительным, по сайтам *NdeI* и *EcoRI* в кассету 115x3-*GUS*-*TMV* был добавлен терминатор нопаин синтазы (*NOS terminator*), ответственный за сигнал полиаденилирования /5/.

Третья конструкция - *HSE-35Smin-115x3-Cell7A-TMV-NOS-pCAMBIA* была получена с помощью замены репортерного гена *GUS* по сайтам рестрикции *NcoI* и *Cfr9I* на ген целлюлазы 7А из гриба *Lentinula edodes* (рисунок 1) /4/.

А – контроль, состоящий из элемента теплового шока (*HSE*), минимального 35S CaMV-



промотора, репортерного гена (*GUS*) и терминатора нопаин синтазы (*NOS*). Б – конструкция, отличающаяся от контроля содержанием энхансерной последовательности (3xARC-1), В – конструкция, в которой репортерный ген *GUS* был заменен на ген фермента целлюлазы из гриба *Lentinula edodes*;

Рисунок 1. Кассеты, обеспечивающие контролируемую экспрессию гена.

Конструкции, различающиеся по наличию или отсутствию энхансерных последовательностей были клонированы в бинарную плазмиду *pCAMBIA2300*.

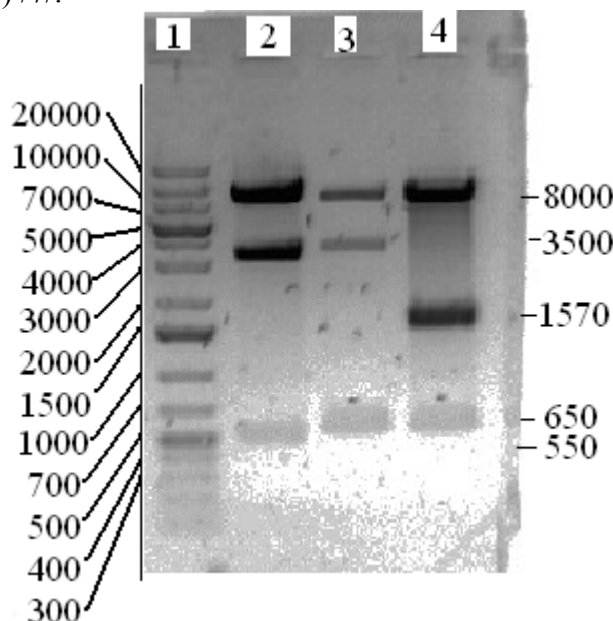
Проверка плазмид на наличие интересующих нас ДНК-фрагментов, осуществлялась методом рестрикции /7/.

Проверка конструкции *HSE-35Smin-GUS-NOS-pCAMBIA* (контроль) была проведена с методом обработки плазмиды рестриктазами *HindIII* и *NcoI*. В этом случае из данной плазмиды мы вырезали кассету, содержащую элемент теплового шока и минимальный 35S-промотор. Длина данного фрагмента примерно 550 пар оснований (п.о.). поскольку в данной плазмиде имеются два сайта рестрикции *NcoI*, дополнительно вырезается фрагмент длиной 3500 п.о., содержащий репортерный ген β-глюкуронидазы (*GUS*), терминатор нопаин синтазы (*NOS-ter*) и промотор нопаин синтазы (*NOS-pro*), ответственный за экспрессию маркерного гена (устойчивость к канамицину).

Конструкция *HSE-35Smin-115x3-GUS-TMV-NOS-pCAMBIA* была проверена с помощью эндонуклеаз *HindIII* и *NcoI*. Данной конструкции элемент теплового шока, минимальный 35S-промотор и энхансерная последовательность объединены в один фрагмент, продукт рестрикции должен быть порядка 650 п.о. (*HSE-35Smin* – 550 п.о., 115x3 – 80 п.о.).

Третья конструкция *HSE-35Smin-115x3-Cell7A-TMV-NOS-pCAMBIA* была обработана рестриктазами *HindIII* и *NcoI* для вырезания фрагмента *HSE-35Smin-115x3*. В рестрикционную смесь был добавлен фермент *Cfr9I* для вырезания гена целлюлазы 7A длиною в 1571 п.о.

Результаты рестрикции были проанализированы с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле (рисунок 2) /7/.



1 - стандартные молекулярные маркеры, 2 - *HSE-35Smin-GUS-NOS-pCAMBIA*, 3 - *HSE-35Smin-115x3-GUS-TMV-NOS-pC*, 4 - *HSE-35Smin-115x3-Cell7A-TMV-NOS-pC*.

Рисунок 2. Проверка конструкций рестрикционным анализом.

Из рисунка 2 видно, что в случае контроля элемент теплового шока и минимальный 35S-промотор имеют длину в 550 п.о. В случае, где присутствует энхансерная последовательность 115x3, длина фрагмента увеличилась и составляет порядка 650 нуклеотидов. При рестрикционном анализе конструкции *HSE-35Smin-115x3-Cell7A-TMV-NOS-pC* длина фрагмента, содержащий элемент теплового шока, минимальный 35S-промотор и энхансерную последовательность 115x3 составляет 650 п.о., и из плазмиды был вырезан ген целлюлазы 7A, длиною 1571 п.о.

В результате исследования были получены ДНК-конструкции, обеспечивающие высокую экспрессию гена и выход белка при помощи трансляционных энхансерных последовательностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маргулис Б.А., Гужова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке. // Цитология, 2001, Т.42. №4. С. 323-342.
2. Bailey-Serres J., Dawe R.K. Both 5'- and 3'-sequences of Maize *adh-1* mRNA are required for enhanced translation under low oxygen conditions.//Plant physiol., 1996, Vol.112. P. 685-695.
3. Nover L., Neumann D., Sharf K-D. Heat shock and other stress response systems of plants// Results and problems in cell differentiation. 1989, Vol.16: P. 156-170.

4. Charles C. Lee, Dominic W.S. Wong, George H. Robertson. Cloning and characterization of two cellulase genes from *Lentinula edodes* and *Trichoderma reesei*// FEMS Microbiology Letter, 2005 (2001), P.355-360.
5. Gallie D.R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency // Genes Devel., 1991, Vol.5. –P.2108-2116.
6. R. Zh. Akbergenov, S. Sh. Zhanybekova, R. V. Kryldakov, A. Zhigailov, N. S. Polimbetova, T. Hohn and B. K. Iskakov. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs // Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 1, P. 239-247.
7. Maniatis T. et al. Molecular cloning, Book I, 1989.

Зерттеу жұмыстарының нәтижесі ретінде өсімдік организмінде енгізілетін гендердің (*β -глюкуронидаза (GUS) және целлюлаза 7A ферменттері*) құрамында энхансерлік тізбектерінің көмегімен жоғары деңгейлі экспрессиясын камтамасыз ететін және жылу шоғының реттегіш элементтері бар ДНҚ-конструкциялары алынды.

As a result of experiment were obtained: (i), DNA-constructs containing enhancer elements (3xARC-1 and TMV), reporter gene GUS, 35S CaMV minimal promoter and heat shock element (HSE), (ii) DNA-constructs giving controllable high level of expression of cellulase 7A gene in plants due to enhancing and heat shock elements.

ӘОЖ: 556.11

А.А. ЕШИБАЕВ

СУДЫҢ АУЫР МЕТАЛ ИОНДАРЫМЕН ЛАСТАНУ ДӘРЕЖЕСІН ӨСІМДІКТЕР АРҚЫЛЫ ТЕСТІЛЕУ

М.Әуезов атындағы Оңтүстік –Қазақстан мемлекеттік университеті, өндірістік экология және биотехнология ғылыми-зерттеу институты

*Оңтүстік Қазақстан облысының табиғи су көздеріндегі гидромакрофиттердің су ортасының ауыр металл иондарымен ластану дәрежесін тестілеу қабілеттері зерттелді. Зерттелген су өсімдіктерінің ішінде су ортасындағы мыс, қорғасын және кадмий иондарының жоғары концентрацияларын тестілейтін фито-тесттік нысандар ретінде каролин азолласы (*Azolla caroliniana* L.) мен сірне бөденешөбі (*Veronica beccabunga* L.) табылды.*

Фитоиндикация қоршаған ортаның экологиялық жағдайын бақылаудағы ақпаратты және экономикалық тұрғыдан тиімді тәсілдердің бірі болып саналады. Гидромакрофиттер қауымдастығы техногендік факторлардың әсерін айқын анықтайтын нысандар. Олар техногендік әсерге түрлік құрамы мен морфометрикалық көрсеткіштерінің өзгеруі арқылы жауаптық реакция көрсетеді. Белгілі жүктеме жағдайында, сол ортаға бейімделген түрлерден доминантты топтамалар түзіледі. Мұндай түрлер, ережелі түрде, басымдылықты иемденеді /1/. Биоиндикация молекулалық, жасушалық, ағзалық, популяциялық, қауымдастық және экожүйе деңгейіндегі өзгерістер арқылы анықталады /2/. Қазіргі кезде, биоиндикация әдістері әлемдегі дамыған елдерде экожүйедегі ауытқуларды бақылауда кеңінен пайдаланып