

ГНАТЮК І. С.^{1,2✉}, ВАРЧЕНКО О. І.^{1,2}, ПАРІЙ М. Ф.^{2,3}, СИМОНЕНКО Ю. В.^{1,2}¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: ignatyuk94@gmail.com² Всеукраїнський науковий інститут селекції (ВНІС), Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30, e-mail: biotechvnis@gmail.com³ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15✉ ignatyuk94@gmail.com, (066) 693-93-58

СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМУ РОСЛИН, ЩО НЕСЕ ГЕН СИНТЕЗУ БАКТЕРІАЛЬНОГО БІЛКА CAS9

Мета. Створення генетичної конструкції для редагування геному рослин, що містить ген синтезу бактеріального білка Cas9, репортерний ген β -глюкуронідази *gus*, а також маркерний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*. **Методи.** В роботі використовували молекулярно-біологічні, біотехнологічні, мікробіологічні та біоінформаційні методи; для створення генетичних конструкцій – метод молекулярного клонування Golden Gate. **Результати.** В результаті роботи створено генетичну конструкцію pSPE2053, яка несе ген синтезу ендонуклеази Cas9, гени *gus* та *bar*; правильність збірки всіх елементів вектора підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції; конструкцію перенесено в клітини *Escherichia coli* та *Agrobacterium tumefaciens*; експресію гена β -глюкуронідази перевірено за допомогою гістохімічного аналізу після транзійтної генетичної трансформації махорки *Nicotiana rustica* L. **Висновки.** Створена генетична конструкція може бути використана для редагування геному рослин як за стабільної, так і за транзійтної генетичної трансформації для накопичення рекомбінантного білка Cas9. В такі рослини в подальшому можуть бути перенесені послідовності направляючих РНК із використанням або стабільної/транзійтної генетичної трансформації або традиційних методів схрещування.

Ключові слова: клонування, генетична конструкція, гени *gus* та *bar*, білок ендонуклеаза Cas9, транзійтна експресія.

Зі зростанням кількості населення та впливом зміни клімату на сільське господарство виникає потреба в культурах із більшою врожайністю та толерантністю до абіотичного стресу. Однак традиційне поліпшення рослин за допомогою генетичної рекомбінації або випад-

кового мутагенезу є трудомістким і не може йти в ногу зі зростанням попиту на продукцію. Такий метод редагування геному, як короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами (CRISPR) / CRISPR-асоційовані білки (CRISPR/Cas), дозволяють цілеспрямовано модифікувати майже будь-яку послідовність геному рослин, щоб генерувати зміни та прискорювати селекційний процес [1]. Важливим моментом під час роботи з системою CRISPR/Cas9 є ретельний підбір сайтів для специфічного внесення дволанцюгового розриву. Необхідність попереднього біоінформаційного аналізу пояснюється можливістю нецільових ефектів – внесення неспецифічних дволанцюгових розривів у геном. Вибираючи потрібні сайти, слід уникати ділянок повторених послідовностей, а також ділянок, що мають високу гомологію з іншими ділянками геному.

Впізнання гена-мішені системою CRISPR/Cas9 здійснюється за рахунок комплементарної взаємодії між некодуючою РНК і ДНК цільових сайтів. При цьому утворюється комплекс із некодуючих РНК і білків Cas, які мають нуклеазну активність. Білок Cas9 є ендонуклеазою, що здійснює розривання ланцюга ДНК, тим самим вносячи в нього як окремі точкові мутації, так і більші за розміром делеції. Наслідком цього є те, що, залежно від місця внесення розривів, ген може бути інактивованим, продукт його експресії може виявитися нефункціональним або, навпаки, набувати нових властивостей [2]. Таким чином, використовуючи метод геномного редагування CRISPR-Cas9, можна отримати нові форми рослин з новими цінними властивостями.

Для трансформації клітинних культур людини, мишей та інших організмів використовують плазмиди, які забезпечують активну проду-

кцію нуклеази Cas9 і некодуєчої РНК *in vitro*. У випадку трансформації цілого організму розроблено метод, який ґрунтується на мікроін'єкції мРНК Cas9 і некодуєчих РНК в ембріони. Цей метод активно застосовують у мишей, смугастого данію (*Danio rerio*) та дрозофіли. У рослин, клітини яких мають щільну клітинну стінку, широко застосовується метод плазмідної трансформації протопластів у клітинних культурах, а також інфільтрація за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*.

Використання системи CRISPR/Cas9 має ряд переваг: її значно простіше створити, вона має більш високу ефективність і підходить для високопродуктивного і мультиплексного редагування геному в найрізноманітніших клітинних лініях і живих організмах. Для переорієнтації на нову мішень потрібно тільки змінити 20-нуклеотидну направляючу послідовність некодуєчої РНК [3].

Плазміди, які використовуються для стабільного редагування геному рослин, мають складатися з направляючої (single guide) sgРНК касети (20-нт послідовність, яка впізнає цільову ДНК), CRISPR/Cas касети та селективної касети (гени для відбору відредагованих тканин) [1].

Метою нашої роботи було створення генетичної конструкції для редагування геному рослин, що містить ген синтезу бактеріального білка Cas9 для його накопичення в тканинах рослин, репортерний ген β -глюкуронідази *gus* – для швидкої детекції трансгенних клітин та маркерний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar* – для подальшого відбору трансгенних тканин у культурі *in vitro*.

Матеріали і методи

Створення генетичних конструкцій

Генетичну конструкцію створювали за допомогою методу модульного молекулярного клонування Golden Gate (MoClo) [4, 5].

Для конструювання трьох транскрипційних одиниць використовували такі елементи (модулі L0 рівня): 1) pICH42211 – промотор гена *nos* (*A. tumefaciens*); pICH44222 – 5'-послідовність, що не транлюється (5'UTR), з вірусу мозаїки огірка CMV1 (Cucumber Mosaic Virus); pSPE2049 – послідовність гена Cas9 + сигнальний пептид ядерної локалізації та pICH72400 – термінатор гена *Atug7* разом із сигналом поліаденюлювання та 3'-послідовністю (3'UTR), що не транлюється (*A. tumefaciens*); 2) pICH44157 – промотор гена

RbcS2B (AT5g38420, *A. thaliana*); pICH44179 – 5'-послідовність, що не транлюється (5'UTR), з гена *RbcS2B* (AT5g38420, *A. thaliana*); pICH43844 – послідовність гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази, *bar* (*S. hygrosopicus*) з інтроном, який було виділено з гена *ACT2* (*A. thaliana*), та pICH41432 – термінатор гена *ocs* разом із сигналом поліаденюлювання та 3'-послідовністю (3'UTR), що не транлюється (*A. tumefaciens*); 3) pICH45089 – подвійний 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV (Cauliflower Mosaic Virus); pICH78133 – 5'-послідовність Ω , що не транлюється (UTR), з вірусу тютюнової мозаїки TMV (Tobacco Mosaic Virus) + хлоропластний транзитний пептид із гена *RbcS* (синтетичний); pICH75111 – ген β -глюкуронідази, *gus* (*E. coli*) з двома інтронами та pICH41414 – 35s термінатор разом із сигналом поліаденюлювання та 3'-послідовністю (3'UTR), що не транлюється, з вірусу тютюнової мозаїки TMV (Tobacco Mosaic Virus).

Базові генетичні модулі були люб'язно надані Dr. Nicola Patron з MoClo Plant Parts Kit (Addgene kit # 1000000047) та Dr. Sylvestre Marillonnet з MoClo Toolkit (Addgene kit # 1000000044)" [5–7]. Рестрикційні ферменти та лігазу T4 використовували відповідно до статті Engler зі спів. (2008) [4].

Для створення трьох транскрипційних одиниць першого рівня (вектори L1 рівня) реакційна суміш містила: по 100 нг кожної клонованої послідовності та 100 нг вектора першого рівня, 1,5 мкл 10x лігазного буфера (Thermo Fisher Scientific), 0,15 мкл 10 мг/мл стоку BSA (бичачий сироватковий альбумін), 2 одиниці рестриктази *BsaI*, 3 одиниці лігази T4, що доводили до кінцевого об'єму 15 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Реакційну суміш інкубували в термостаті за 37°C протягом 3 год. Інактивацію здійснювали 5 хв за 50°C і 5 хв за 80°C.

Три транскрипційні одиниці першого рівня (pSPE2050, pSPG2051 та pSPH2052) перенесли в компетентні клітини *Escherichia coli* Fasta методом heat-shock [8, 9] та відбирали позитивні колонії методом біло-блакитної селекції [10].

Для створення генетичної конструкції pSPE2053 другого рівня (вектор L2 рівня) реакційна суміш містила: по 100 нг кожної клонованої транскрипційної одиниці у векторах першого рівня та 100 нг вектора другого рівня, 1,5 мкл 10x лігазного буфера (Thermo Fisher Scientific), 0,15 мкл 10 мг/мл стоку BSA (бичачий сироват-

ковий альбумін), 2 одиниці рестриктази *Bpi*I, 3 одиниці лігази T4, що доводили до кінцевого об'єму 15 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Реакційну суміш інкубували в термостаті за 37°C протягом 3 год. Інактивацію здійснювали 5 хв за 50°C і 5 хв за 80°C.

Рекомбінантну плазмідну ДНК трансформували як у штам *Escherichia coli* Fasta, так і в штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Полімеразна ланцюгова реакція

Для детекції послідовності гена *Cas9* в кінцевій генетичній конструкції pSPE2053 проводили полімеразну ланцюгову реакцію зі специфічними праймерами до гена *Cas9*.

Реакційна суміш містила: специфічні праймери, по 2 мкл буфера для ПЛР 10x DreamTaq™ GreenBuffer (Thermo Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфату (Thermo Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific). Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q. В роботі використовували такі праймери:

Cas9 форвардний праймер: 5'-TTG-AAG-ACA-AAA-TGA-TGG-ATA-AGA-AGT-ACT-CTA-TCG-GA-3';

Cas9 реверсний праймер: 5'-TTG-AAG-ACA-AAA-GCT-CAA-ACC-TTC-CTC-TTC-TTC-TTA-GG-3'.

Довжина очікуваного фрагмента – 4136 пн.

ПЛР-аналіз проводили за такою схемою: початкова денатурація 5 хв за 94°C, 35 циклів – денатурація 45 с за 94°C, ренатурація 45 с за 55°C, елонгація 4 хв 30 с за 72°C, фінальна елонгація 15 хв за 72°C.

Для візуалізації смуг ДНК здійснювали розділення фрагментів продуктів ампліфікації в агарозному гель-електрофорезі.

Рослинний матеріал

Рослини махорки *Nicotiana rustica* L. вирощували в умовах теплиці за 25/18°C та 16/8 годинного фотоперіоду (день/ніч відповідно). Для інфільтрації використовували листки середнього ярусу 4-х тижневих рослин. Насіння махорки було люб'язно надано к. б. н. Белокуровою В. Б. з Колекції зародкової плазми рослин флори України та світової флори (ІКБГ НАН України).

Транз'єнтна *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин махорки

***Nicotiana rustica* L.**

Нічну культуру *A. tumefaciens* GV3101, що містила створену генетичну конструкцію pSPE2053, вирощували за температури 28°C протягом 18 годин у середовищі LB [11], яке містило такі антибіотики: рифампіцин – 50 мг/л, канаміцин – 100 мг/л, гентаміцин – 25 мг/л. Клітини агробактерій центрифугували та ресуспендували в буфері для інфільтрації (10 мМ MgSO₄, рН 5,6–5,8) з кінцевою оптичною щільністю OD₆₀₀ = 1. Інфільтрацію листків 4-х тижневих рослин махорки *N. rustica* L. проводили за допомогою шприца отриманою суспензією [12].

Гістохімічний аналіз експресії гена β-глюкуронідази

Для аналізу транз'єнтної експресії гена *gus* в інфільтрованих листових тканинах махорки *N. rustica* L. було проведено гістохімічний аналіз експресії гена β-глюкуронідази згідно з методикою Jefferson (1987) в 100 мМ фосфатному буфері рН 7,0, який містив 1 мМ X-Gluc [13]. На 4-й день після агроінфільтрації фрагменти листків махорки *N. rustica* вирізували та інкубували протягом ночі в 1 мМ розчині X-Gluc з наступним відмиванням в етиловому спирті.

Результати та обговорення

Для створення генетичних конструкцій ми використовували метод молекулярного клонування *Golden Gate*, що ґрунтується на використанні рестриктаз IIS типу та T4 ДНК-лігази. На першому етапі створення конструкцій усі елементи (модулі в L0 рівня) перевіряли рестрикційним аналізом. Усі модулі клонували в кінцевий вектор для збірки (вектор L1 рівня), що містить ген *lacZ*, який кодує фермент β-галактозидазу, що розщеплює дисахарид лактозу на глюкозу та галактозу, для біло-блакитного скринінгу бактерій. У результаті першого етапу роботи нами було клоновано три генетичні конструкції першого рівня – pSPE2050, pSPR2051 та pSPH2052, які містили окремі транскрипційні одиниці для експресії гена бактеріального білка *Cas9*, гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar* та гена β-глюкуронідази *gus* (рис. 1). Біло-блакитний скринінг дозволив швидко детектувати колонії з, імовірно, позитивним результатом. Створені конструкції перевіряли ПЛР та рестрикційним аналізом.

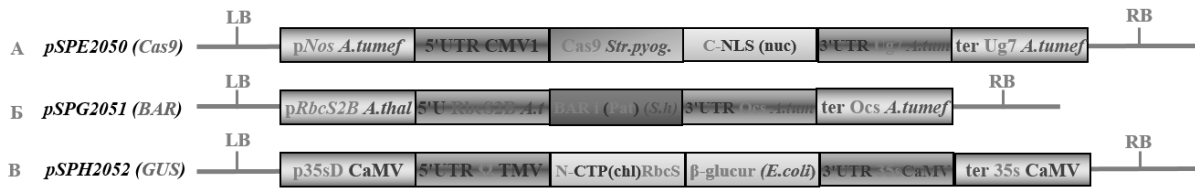


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК створених векторів першого рівня: *A* – вектор pSPE2050 з геном бактеріального білка Cas9 за контролю промотора гена *nos* та термінатора гена *Atug7*; *B* – вектор pSPG2051 з геном фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) за контрол промотора гена *RbcS2B* та термінатора гена *ocs*; *C* – вектор pSPH2052 з геном β-глюкуронідази (*gus*) за контролю подвійного 35S промотора CaMV та 35S термінатора CaMV.

Під час створення генетичних конструкцій, крім кодуєчих послідовностей генів та регуляторних елементів (промотори та термінатори), нами були також використані послідовності, що не транскрибуються, – 5'UTR різного походження. Це зумовлено тим, що використання в якості додаткового регуляторного елемента синтетичної консенсусної 5'UTR послідовності призводить до збільшення рівня накопичення рекомбінантного білка майже на 25 %. Значною мірою це пов'язано з наявністю низки регуляторних послідовностей у складі 5'UTR мРНК, які можуть визначати як характер зв'язування з різними регуляторними білками, так і рівень стабільності транскрипту [14, 15].

Із літературних джерел відомо, що у векторах, які використовують для редагування геному рослин, ген синтезу бактеріального білка Cas9 зазвичай розміщують під контроль нативного або подвійного 35S промоторів вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) (35S та d35S CaMV) [16]. Однак у роботі Wei H. зі спів. (2006) було з'ясовано, що макси-

мальна активність ферменту β-глюкуронідази спостерігалася під час використання промотора гена нопалінсинтази *nos*, за контролю якого знаходився відповідний ген (порівняно з двома мінімальними промоторами 35S CaMV). Тому в нашій роботі ген синтезу білка Cas9 помістили під контроль промотора гена *nos* [17].

Після рестрикційного аналізу створених векторів першого рівня (pSPE2050, pSPR2051 та pSPH2052) відповідні плазмиди виділяли з клітин *E. coli* та клонували у вектор другого рівня (вектори L2 рівня). Комп'ютерну карту створеної генетичної конструкції pSPE2053 зображено на рис. 2. Далі здійснювали перенос рекомбінантної плазмідної ДНК в компетентні клітини *E. coli* Fasta, виділяли плазмідну ДНК та проводили молекулярно-біологічний аналіз створеної конструкції (рис. 3). За допомогою ПЛР аналізу було доведено наявність гена синтезу білка Cas9 в створеній конструкції. Далі перевіреною плазмідною трансформували компетентні клітини *Agrobacterium tumefaciens*, штам GV3101.

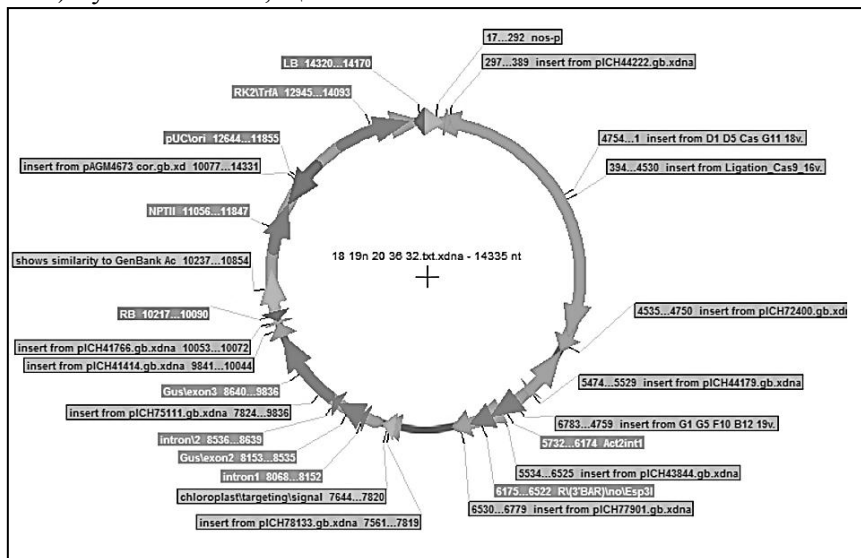


Рис. 2. Комп'ютерне моделювання *in silico* створеної плазмиди pSPE2053, що містить ген синтезу бактеріального білка Cas9 (програма SerialCloner).

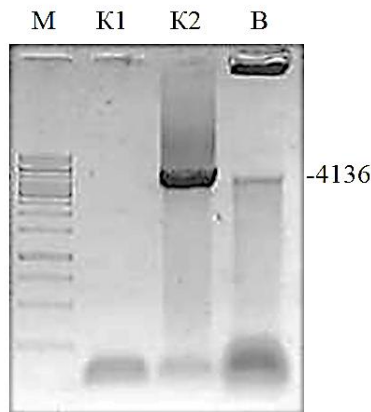


Рис. 3. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації послідовності гена *Cas9* в плазмідній ДНК (pSPE2053): K1 – негативний контроль – Milli-Q; K2 – позитивний контроль – плазмідна ДНК pSPE2050, що містить ген синтезу бактеріального білка *Cas9*; В – плазмідна ДНК з колонії *A. tumefaciens* GV3101, що містить створену генетичну конструкцію pSPE2053; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Далі було проведено транзйентну генетичну трансформацію суспензією агробактерій листків рослин махорки *Nicotiana rustica* L. – одного з модельних видів роду *Nicotiana*. Серед видів цього роду найчастіше використовують *N. benthamiana* Domin, який є модельним видом для дослідів за транзйентною експресією гена *Cas9* в рослинах. Наприклад, Nekrasov зі спів. (2013) у своїй роботі для перевірки генетичної конструкції з геном *Cas9*, який було зшило з геном *GFP*, використовували агроінфільтрацію рослин *N. benthamiana* [18]. А Baltes N. зі спів. (2015) показали можливість отримання стійкості до гемінівірусів, використовуючи коінфільтрацію рослин *N. benthamiana* агробакте-

ріальними конструкціями, що несли конструкції з генами *Cas9* та *GFP* [19].

Для аналізу транзйентної експресії гена *gus* в інфільтрованих листових тканинах махорки *N. rustica* L. було проведено гістохімічний аналіз експресії гена β-глюкуронідази відповідно до статті Jefferson (1987) [13]. Гістохімічний аналіз GUS-активності показав високу експресію гена *gus* у листках 4-х тижневих інфільтрованих рослин махорки (рис. 4), у водночас у контрольних (неінфільтрованих) тканинах рослин махорки GUS-активності не було виявлено.

Висновки

Таким чином, у результаті роботи нами було створено генетичну конструкцію pSPE2053, що несе ген синтезу бактеріальної ендонуклеази *Cas9*, репортерний ген β-глюкуронідази *gus*, а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*. У дослідженні вперше була показана можливість використання рослин махорки *Nicotiana rustica* L. для транзйентної експресії гена *Cas9* та накопичення рекомбінантного білка – ендонуклеази *Cas9*. Створена генетична конструкція може бути використана для редагування геному рослин як за стабільної, так і за транзйентної генетичної трансформації для накопичення рекомбінантного білка *Cas9*. В такі рослини, в подальшому можуть бути перенесені послідовності направляючих РНК (із використанням або стабільної/транзйентної генетичної трансформації або традиційних методів схрещування).

Робота виконувалася в рамках наукового проекту ІКБГІ НАН України: III-1-15 «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах».

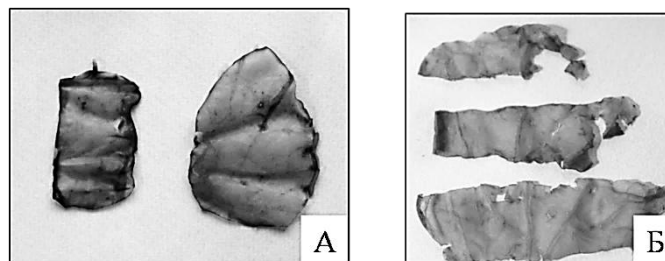


Рис. 4. Гістохімічний аналіз експресії гена β-глюкуронідази *gus* у листових тканинах махорки *Nicotiana rustica* L.: А – фрагменти листків махорки після інфільтрації суспензією *A. tumefaciens* GV3101, що містить створену генетичну конструкцію pSPE2053; Б – фрагменти листків контрольних (неінфільтрованих) рослин махорки.

References

1. Yue J.-J., Hong C.-Y., Wei P., Tsai Y.-C., Lin C.-S. How to start your monocot CRISPR/Cas project: plasmid design, efficiency detection, and offspring analysis. *Rice*. 2020. Vol. 13. doi.org/10.1186/s12284-019-0354-2.
2. Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014. Vol. 346. doi: 10.1126/science.1258096.
3. Nemudryy A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. Sistemy Redaktirovaniya Genomov TALEN I CRISPR/Cas – Instrumenty Otkrytiy. *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6. P. 20–42. [in Russian] / Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий. *Acta Naturae*. 2014. Том 6. С. 20–42.
4. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS One*. 2008. Vol. 3. e3647. doi: 10.1371/journal.pone.0003647.
5. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multi-gene constructs. *PLoS One*. 2011. Vol. 6 (2). e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765.
6. Engler C., Youles M., Gruetzner R., Ehnert T.-M., Werner S., Jones J.D., Patron N.J., Marillonnet S. A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology*. 2014. Vol. 3, № 11. P. 839–843. doi: 10.1021/sb4001504.
7. Werner S., Engler C., Weber E., Gruetzner R., Marillonnet S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs*. 2012. Vol. 3, № 1. P. 38–43. doi: 10.1371/journal.pone.0016765.
8. Van Die I., Bergmans H., Hoekstra W. Transformation in *Escherichia coli*: Studies on the Role of the Heat Shock in Induction of Competence. *Microbiology*. 1983. Vol. 129. P. 663–670. doi.org/10.1099/00221287-129-3-663.
9. Froger A., Hall J. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments*. 2007. Vol. 6. e253. doi: 10.3791/253.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 545 p.
11. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1951. Vol. 62 (3). P. 293–300.
12. Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., Stahnke J., Lai H., Zhou X., Chen Q. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2013. Vol. 77. e50521. P. 1–9. doi: 10.3791/50521.
13. Jefferson R. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1987. Vol. 5. P. 387–405.
14. Quimisse M.G., Kabardaeva K.V., Gra O.A., Tyurin A.A. Contribution of Consensus 5'-Untranslated Region to the Translational Efficiency of Heterologous Genes in Plant Cells. Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia: Series Agronomy and Animal Industries. 2015. Vol. 3. P. 56–68. [in Russian] / Кимиссе М.Г., Кабардаева К.В., Гра О.А., Тюрин А.А. Вклад консенсусной 5'-нетранслируемой области в эффективность трансляции гетерологичных генов в растительных клетках. Вестник Российского университета Дружбы народов: Серия Агронмия и животноводство. 2015. Вып. 3. С. 56–68. doi.org/10.22363/2312-797X-2015-3-56-68.
15. Sugio T., Satoh J., Matsuura H., Shinmyo A., Kato K. The 5'-Untranslated Region of the *Oryza sativa* Alcohol Dehydrogenase Gene Functions as a Translational Enhancer in Monocotyledonous Plant Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008. Vol. 105. P. 300–302. doi: 10.1263/jbb.105.300.
16. Liu X., Wu S., Xu J., Sui C., Wei J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2017. Vol. 7. P. 292–302. doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002.
17. Wei H., Meilan R., Brunner A.M., Skinner J.S., Ma C., Strauss S.H. Transgenic sterility in *Populus*: expression properties of the poplar PTLF, *Agrobacterium NOS* and two minimal 35S promoters in vegetative tissues. *Tree Physiology*. 2006. Vol. 26. P. 401–410. doi.org/10.1093/treephys/26.4.401.
18. Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*. 2013. Vol. 31. P. 691–693. https://doi.org/10.1038/nbt.2655.
19. Baltes N., Hummel A., Konecna E., Cegan R., Bruns A., Bisaro D., Voytas D. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants*. 2015. Vol. 1. 15145. doi: 10.1038/nplants.2015.145.

HNATIUK I.S.^{1,2}, VARCHENKO O.I.^{1,2}, PARIJ M.F.^{2,3}, SYMONENKO Yu.V.^{1,2}

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: ignatyuk94@gmail.com

² Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding (VNIS), Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkivska str., 30, e-mail: biotechvnis@gmail.com

³ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroiv Oborony str., 15

CREATION OF A GENETIC VECTOR CARRYING A SYNTHESIS BACTERIAL PROTEIN GENE CAS9 FOR PLANT GENOME EDITING

Aim. To create a genetic construct carrying the bacterial protein Cas9 gene, the reporter β -glucuronidase *gus* gene, as well as the marker phosphinotricin-N-acetyltransferase *bar* gene for plant genome editing. **Methods.** Molecular-biological, biotechnological, microbiological and bioinformatic methods were used in the study; Golden Gate molecular cloning method was used to create genetic constructs. **Results.** The genetic construct pSPE2053 which carries the Cas9

endonuclease gene, the *gus* and *bar* genes was created; the assembly correctness of all vector elements was confirmed by polymerase chain reaction; the construct was transferred to *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* cells; β -glucuronidase gene expression was verified by histochemical analysis after *Nicotiana rustica* L transient genetic transformation. **Conclusions.** The created genetic construct can be used to edit the plant genome for both stable and transient genetic transformation to accumulate recombinant Cas9 protein. The guide RNA sequences may be subsequently transferred into such plants using either stable or transient genetic transformation or traditional crossing methods.

Keywords: cloning, genetic construction, *gus* and *bar* genes, Cas9 endonuclease protein, transient expression.