

ВАРЧЕНКО О. І.<sup>1,2✉</sup>, КРАСЮК Б. М.<sup>1,4</sup>, ФЕДЧУНОВ О. О.<sup>2,3</sup>, ЗІМІНА О. В.<sup>2,3</sup>, ПАРІЙ М. Ф.<sup>2</sup>, СИМОНЕНКО Ю. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148 б, e-mail: okvarchenko@gmail.com

<sup>2</sup> Всеукраїнський науковий інститут селекції,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30

<sup>3</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

<sup>4</sup> Національний університет біоресурсів та природокористування НААН України,

Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

✉ okvarchenko@gmail.com, (063) 201-52-40

## СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ КЛОНУВАННЯ *GOLDEN GATE*

**Мета.** Створення генетичних конструкцій для вивчення впливу різних регуляторних елементів, а саме промоторів, на експресію репортерного білка GFP. **Методи.** Для створення генетичних конструкцій використовували метод молекулярного клонування Golden Gate, що дозволяє за допомогою рестриктаз IIS типу та T4 ДНК-лігази швидко створювати генетичні вектори. **Результати.** Для досліджень було обрано 6 різних промоторів, а саме 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV (Cauliflower Mosaic Virus), подвійний 35S промотор CaMV, промотори генів RbcS2B та RbcS1B, що кодують малу субодиницю рибулозобісфосфаткарбоксілази (RuBisCo), виділених із Різушки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), та промотори генів, що кодують хлорофіл a-b зв'язуючі білки (LHCB1 та LHCB2), також виділених з *A. thaliana*. Усі транскрипційні одиниці додатково містили такі елементи: 5'-послідовність  $\Omega$ , що не транслюється (UTR), з вірусу тютюнової мозаїки TMV (Tobacco Mosaic Virus); кодуючу послідовність гена *gfp* (Green Fluorescent Protein), виділеного з *A. victoria*, та 35S термінатор CaMV разом із сигналом поліаденювання та 3'-послідовністю, що не транслюється. У результаті роботи створено шість генетичних конструкцій із різними регуляторними елементами, а саме промоторами. **Висновки.** Створені генетичні конструкції можуть бути використані для вивчення впливу різних регуляторних елементів, а саме промоторів, на експресію репортерного білка GFP за транз'єнтної або стабільної генетичної трансформації рослин.

**Ключові слова:** клонування, генетичні конструкції, промотори, зелений флуоресцентний білок (Green Fluorescent Protein, GFP).

Генетичні конструкції є важливою частиною біотехнологій, що дозволяє керувати експресією гетерологічних генів залежно від того, які елементи входять до її складу. Зазвичай рівень експресії гетерологічних генів як за транз'єнтної, так і за стабільної генетичної трансформації має бути високого рівня. Під час створення мультигенних конструкцій більш доцільно використовувати різні елементи в транскрипційних одиницях, адже повтори в різних генах однієї конструкції можуть призводити до замовчування генів [1].

Синтетична біологія спирається на стандартизовані модулі для збирання генетичних конструкцій, з'єднуючи їх разом за певними правилами [2–7]. Чим менше число правил, що визначають стандарт, тим більш широко цей стандарт буде прийнято, оскільки набір інструментів буде меншим і дешевшим, а збірка буде швидша і простіша для автоматизації. Водночас універсальність не повинна бути порушена. Для збірки генетичних систем необхідно, щоб стандарти мали достатню складність, що дозволяє використання різних елементів стандартної генетичної програми, а також забезпечує гнучкість, що дозволяє користувачам включати, наприклад, кінцеві мітки (tag) для очищення білків, сигнальні пептиди для субклітинної локалізації білків та зшивання послідовностей різних генів для вивчення білок-білкових взаємодій.

© ВАРЧЕНКО О. І., КРАСЮК Б. М., ФЕДЧУНОВ О. О., ЗІМІНА О. В., ПАРІЙ М. Ф., СИМОНЕНКО Ю. В.

Метод клонування *Golden Gate* – це метод збирання фрагментів ДНК, що базується на використанні ферментів рестрикції IIS типу [8]. Він має багато особливостей, які є оптимальними для розробки стандарту збірки. Цей метод збирання ДНК дозволяє уникнути деяких неефективних, тимчасових і дорогих стадій молекулярного клонування, зокрема таких, як ампліфікація (ПЛР) фрагментів ДНК, виділення та очищення фрагментів ДНК з гелю, а також розробка нестандартних праймерів. На відміну від інших методів збірки ДНК [9], він не вимагає перекриття фланкуючих послідовностей або сайтів рекомбінації, але вимагає лише відносно невеликих чотирьох пар нуклеотидів, які називаються ф'южн-сайтами, щоб приєднатися до сусідніх модулів, і навіть вони можуть бути спроектовані таким чином, щоб дозволити збір, де це необхідно [10]. Транскрипційні одиниці можуть бути зібрані зі стандартних модульних частин із використанням одностадійної реакції клонування *Golden Gate*, і збірка вищих порядків мультигенних конструкцій може бути виконана з використанням аналогічної процедури [10–12]. Обмеження методу клонування *Golden Gate* полягає в тому, що внутрішні сайти послідовностей розпізнавання для ферментів типу II, що використовуються для збірки, повинні бути вилучені з усіх стартових модулів.

### Матеріали і методи

Для створення транскрипційних одиниць використовували метод клонування *Golden Gate*, що базується на використанні рестриктаз

IIS типу та T4 ДНК-лігази [133]. В роботі ми використовували репортерний ген *gfp*, виділений з *A. victoria*, що кодує зелений флуоресцентний білок (Green Fluorescent Protein, GFP) [14].

Для дослідження впливу різних промоторів на експресію гена *gfp* в генетичних конструкціях, крім кодуючої послідовності гена *gfp* (F9) [14, 15], нами було використано такі регуляторні елементи: шість промоторів – 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) (H2) [16, 17], подвійний 35S промотор CaMV (C1) [18], промотори генів *RbcS2B* та *RbcS1B*, що кодують малу субодиницю рибулозобісфосфаткарбоксілази (RuBisCo), виділену із Різушки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) (G1, H1) [19], та промотори генів, що кодують хлорофіл a-b зв'язуючі білки (LHB1B1 та LHB1B2), також виділені з *A. thaliana* (B2, C2) [20]; 5'-послідовність  $\Omega$ , що не транлюється (UTR), з вірусу тютюнової мозаїки TMV (Tobacco Mosaic Virus) (B5) [21] та 35S термінатор CaMV разом із сигналом поліаденюлювання та 3'-послідовністю, що не транлюється (F11) [16] (рис. 1).

Усі елементи клонували в кінцевий вектор для збірки (20v), що містить ген *lacZ*, який кодує фермент  $\beta$ -галактозидазу, що розщеплює дисахарид лактозу на глюкозу та галактозу, для біло-голубого скринінгу бактерій. Таким чином, транскрипційні одиниці відрізнялися тільки промоторними послідовностями (рис. 1). Клонування проводили за такою схемою:

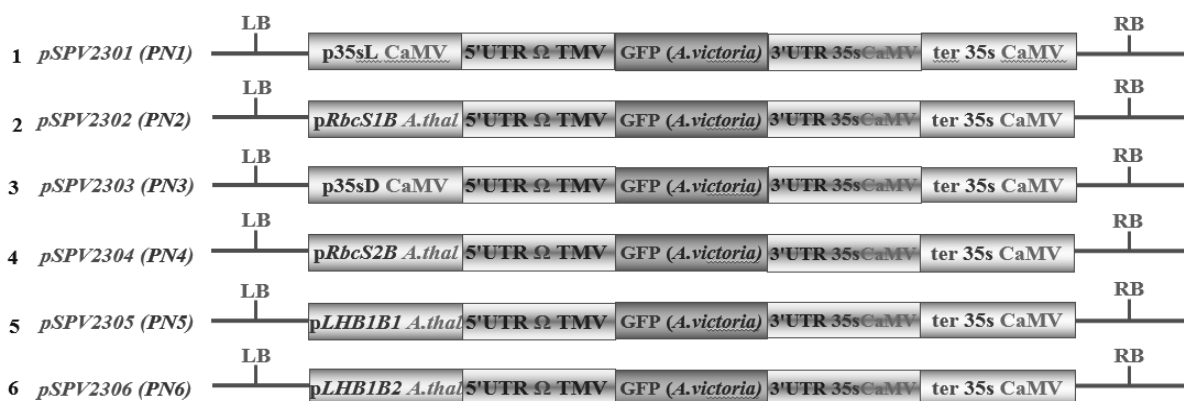


Рис. 1. Схема створених генетичних конструкцій.

1. Змішували всі елементи реакційної суміші.

Buffer Ligase 10x	1,5 µl
Bsa I (restriction enzyme) 10u/ µl	0,2 µl
T4 DNA ligase 10 u/ µl	0,5 µl
Bovine Serum Albumin (BSA) 10mg/ml	0,15 µl
All module elements 100ng/ µl each	1 µl each
MQ water	7,65 µl

Volume total reaction 15 1

2. Інкубували 3 години при 37°C.
3. Інактивація рестриктази 5' 50 °C, інактивація лігази 5' 80 °C.

Продукти клонування трансформували в компетентні клітини *Escherichia coli* штаму *XL-blue* [22, 23]. В роботі використовували білоголубий скринінг для відбору колоній із ймовірно правильно сконструйованими векторами [24], колонії відбирали за додавання 100 mg/L ampicillin. Відібрані колонії після скринінгу нарощували, виділяли плазмідну ДНК за допомогою NID буфера [25], проводили рестрикційний та ПЛР аналіз. Продукти рестрикції та ампліфікації розділяли в агарозному гелі. Комп'ютерне моделювання *in silico* проводили в програмі SerialCloner. Для рестрикційного аналізу використовували рестриктази FastDigest™: Bgl II, NotI, Nde I, Eco32I, HindIII, SalI, XhoI, NdeI, EcoRI; HinfI (ThermoFisher™). ПЛР аналіз проводили для виявлення гена *gfp* в генетичних векторах (розмір продукту ампліфікації 717 bp); для цього використовували такі праймери: F: GTG AGC

AAG GGC GAG GA; R: TTA CTT GTA CAG CTC GTC.

ПЛР аналіз проводили за такою схемою:

I – первинна денатурація (94 °C 300 секунд).

II – а) денатурація (94 °C 30 секунд);

б) відпал праймерів (55 °C 30 секунд);

в) елонгація (72 °C 60 секунд).

III – кінцева елонгація (72 °C 600 секунд).

Перевіреніми плазмідами трансформували компетентні клітини *Agrobacterium tumefaciens*, штам GV3101 методом freeze/thaw [26]. Далі на отриманих колоніях, що пройшли селекцію (рифампіцин 50 мг/л, гентаміцин 25 мг/л, карбеніцилін 100 мг/л), проводили ПЛР аналіз з праймерами до гена *gfp*.

### Результати та обговорення

На першому етапі всі елементи (модулі) для створення конструкцій перевіряли рестрикційним аналізом (рис. 2а, 2б, 3в). Для перевірки елементів F9, F11, B5, G1, H1, B2 використовували рестриктазу HinfI (ThermoFisher™), для C1, H2 – Bgl II (FastDigest™), 20 вектор (destination vector) – Nde I, B2 – Eco32I, C2 – HindIII+SalI з такими довжинами фрагментів рестрикції: F9 – 1225, 994, 396, 213, 75, 65 bp; F11 – 994, 673, 396, 213, 75, 65, 39 bp; B5 – 994, 575, 396, 213, 75, 65 bp; H1 – 994, 502, 396, 320, 272, 213, 169, 75, 65, 37, 7 bp; G1 – 1203, 994, 396, 213, 75, 65 bp; B2 – 994, 772, 396, 306, 213, 75, 65, 60 bp; C2 – 2457, 357 bp; C1 – 2677, 327bp; H2 – 2929, 746, 413 bp; 20v – 4372, 596 bp.

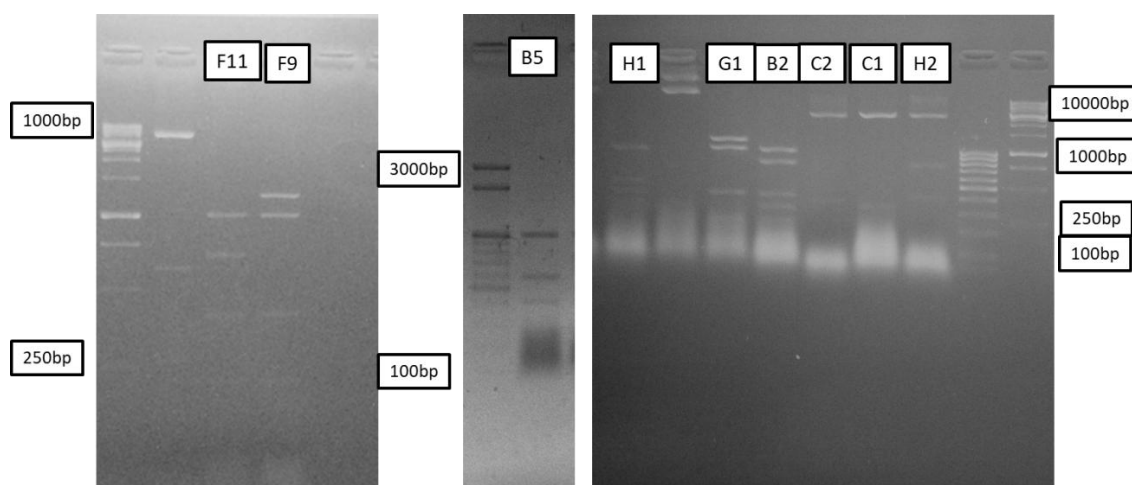


Рис. 2. Електрофореграма продуктів рестрикції модульних елементів.

У результаті роботи було створено шість генетичних конструкцій, що відрізнялися тільки промоторними послідовностями. Біло-голубий скринінг (рис. 3г) дозволив швидко детектувати колонії з ймовірно позитивним результатом. Для точної детекції проводили рестрикційний аналіз плазмідної ДНК (рис. 3а, 3б), виділеної з білих колоній: PN1 – Bgl II (5983; 746 bp); PN2 – Bgl II (5802; 327bp); PN3 – NotI + XhoI (4228, 1843 bp) PN4 – NdeI + EcoRI (3903, 2272 bp)

PN5 – NdeI (4500, 1506 bp) PN6 – NdeI + EcoRI (3903, 2036 bp).

Для ПЛР аналізу в якості матриці використовували плазмідну ДНК з тих колоній, що мали позитивний результат під час проведення рестрикційного аналізу (рис. 4). У результаті перевірки усіх конструкцій за ПЛР аналізу на працювався фрагмент 717 bp, що відповідав довжині відповідно до підібраних праймерів до гена *gfp*.

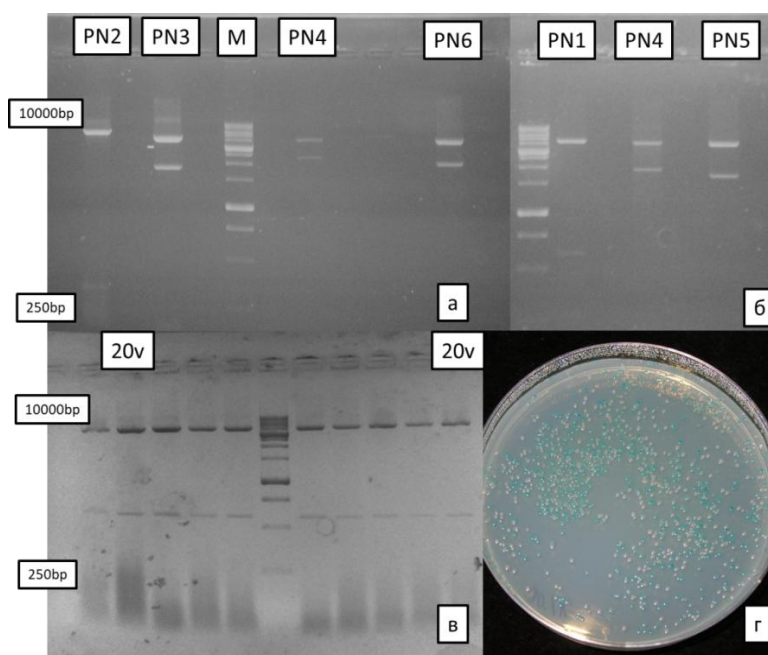


Рис. 3. а, б – рестрикційний аналіз створених конструкцій; в – рестрикційний аналіз векторів (20v) (destination vector); г – біло-голубий скринінг колоній *E. coli*.

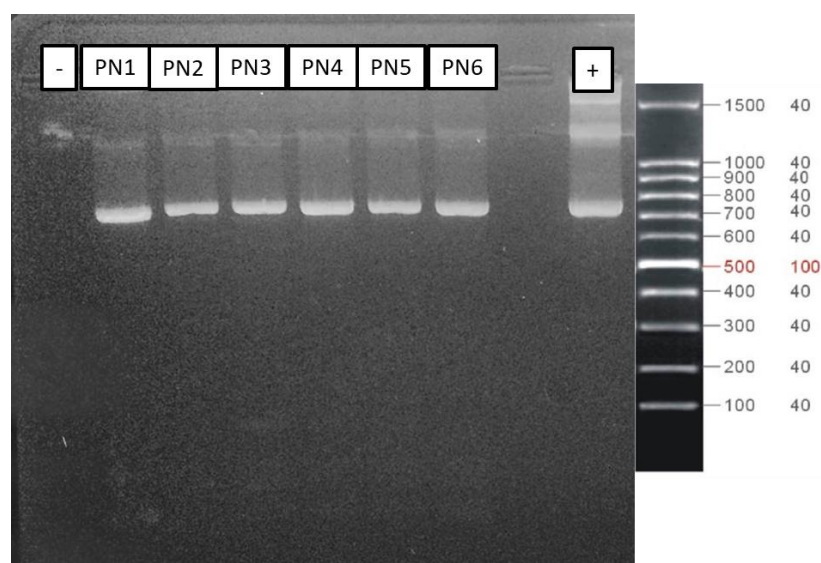


Рис. 4. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації гена *gfp* у плазмідній ДНК.

Далі перевіреніми плазмідами трансформували компетентні клітини *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101. На окремих одержаних колоніях (рис. 5а) проводили ПЛР аналіз на наявність гена *gfp* (рис. 5б).

Таким чином, було підтверджено правильність збірки всіх елементів модульної системи та отримано шість генетичних конструкцій, які в подальшому будуть використані для вивчення впливу різних регуляторних елементів, а саме промоторів, на експресію репортерного білка GFP за стабільної або транзійної генетичної трансформації рослин.

Як зазначалося вище, метод клонування Golden Gate – це проста стратегія швидкого субклонування, яка використовується для перенесення будь-якого необхідного фрагмента ДНК з проміжного вектору у вектор експресії, і не залишає послідовностей сайтів рекомбінації в ДНК. Це спосіб збирання багатокомпонентної ДНК, який дозволяє паралельно збирати декілька фрагментів ДНК. Він ґрунтується на ідеях традиційного методу рестрикційного розрізання та лігування ДНК, проте клонування Golden Gate проводиться в одній пробірці з майже 100 % ефективністю і використовує ендонуклеази рестрикції *Pst* типу, при цьому під час клонування використовується тільки одна ендонуклеаза рестрикції *Pst* типу.

Цей метод був запропонований у 2008 році Dr. Marillonnet зі спів. [8]. Вони розробили

цю систему на противагу більш традиційним сайт-специфічним системам рекомбінації, зокрема таким, як система Gateway від компанії Invitrogen і система Creator Cloning від компанії Clontech. Хоча ці технології є ефективними, простими у використанні і гнучкими, вони обмежені, оскільки послідовності сайтів рекомбінації довжиною 8–13 амінокислот залишаються в кінцевій конструкції. Можна усунути ці сайти рекомбінації з кінцевих векторів для експресії за допомогою інтронів. Однак цей спосіб може бути застосований тільки в еукаріотичних системах і не може бути жодних небажаних сайтів сплайсінгу в послідовностях білка. Клонування Golden Gate має багато переваг, оскільки воно дозволяє уникати деяких неефективних, трудомістких і дорогих етапів традиційного молекулярного клонування, наприклад, ПЛР-ампліфікація, гель-очищення та замовлення звичайних праймерів. Вона не вимагає перекривання фланкуючих послідовностей або послідовностей сайтів рекомбінації всередині ДНК, що підлягають клонуванню.

Метод клонування Golden Gate набув широкого використання в багатьох лабораторіях світу. За його допомогою було створено пул векторів, які дозволили експресувати багато рекомбінантних білків [27–31]. У наших дослідженнях підтверджено ефективність та універсальність такого методу клонування.

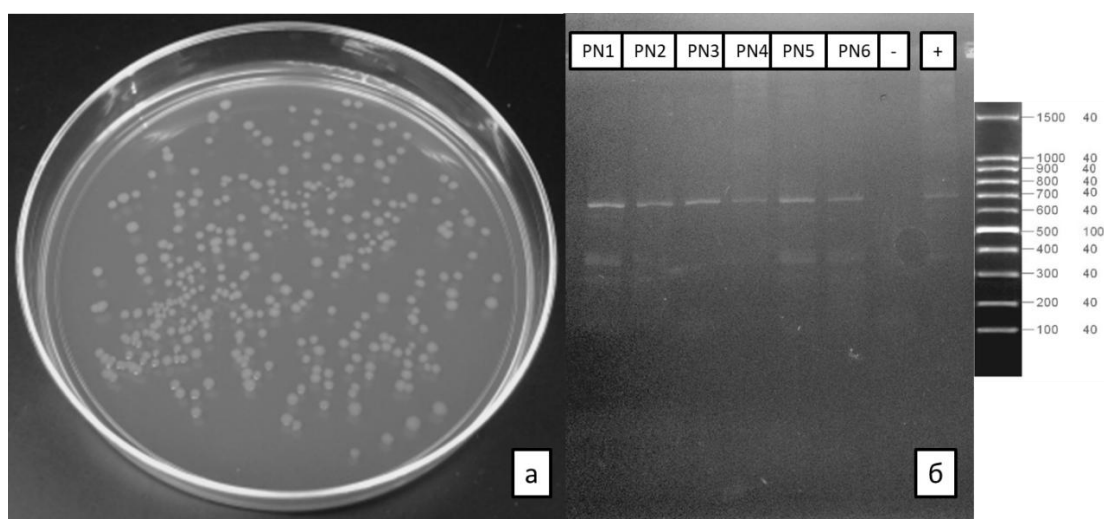


Рис. 5. а – колонії бактерій *Agrobacterium tumefaciens* після трансформації на селекційному середовищі; б – електрофореграма розділення продуктів ампліфікації гена *gfp*.

**Висновки**

У результаті роботи було отримано шість генетичних конструкцій, які містять репортерний ген *gfp* та різні регуляторні елементи, а саме промотори.

Ці конструкції можуть бути використані для вивчення впливу різних регуляторних елементів, а саме промоторів, на експресію репортерного гена *gfp* за стабільної або транзійної генетичної трансформації модельних видів рослин.

**References**

1. Redberry G. Gene silencing: new research. New York: Nova Science Publishers. 2006. 212 p.
2. Kahl L.J., Endy D. A survey of enabling technologies in synthetic biology. *J. Biol. Eng.* 2013. Vol. 7. P. 13.
3. Anderson J.C., Dueber J.E., Leguia M., Wu G.C., Goler J.A., Arkin A.P., Keasling J.D. BglBricks: A flexible standard for biological part assembly. *J. Biol. Eng.* 2010. Vol. 4. P. 1.
4. Shetty R.P., Endy D., Knight T.F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J. Biol. Eng.* 2008. Vol. 2. P. 5.
5. Shetty R., Lizarazo M., Rettberg R., Knight T.F. Assembly of BioBrick standard biological parts using three antibiotic assembly. *Methods Enzymol.* 2011. Vol. 498. P. 311–326.
6. Sleight S.C., Bartley B.A., Lieviant J.A., Sauro H.M. In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Res.* 2010. Vol. 38. P. 2624–2636.
7. Xu P., Vansiri A., Bhan N., Koffas M.A.G. ePathBrick: a synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. *ACS Synth. Biol.* 2012. Vol. 1. P. 256–266.
8. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One.* 2008. Vol. 3. P. 3647.
9. Ellis T., Adie T., Baldwin G.S. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integr. Biol. (Camb).* 2011. Vol. 3. P. 109–118.
10. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet, S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One.* 2011. Vol. 6. P. 16765.
11. Sarrion-Perdigones A., Falconi E.E., Zandalinas S.I., Juárez P., Fernándezdel-Carmen A., Granell A., Orzaez D. GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One.* 2011. Vol. 6. P. 21622.
12. 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. P. 38–43.
13. Engler C., Gruetzner R., Kandzia R., Marillonnet S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One.* 2009. Vol. 4, № 5. P. 5553.
14. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science.* 1994. Vol. 263. P. 802–805.
15. Chiu W-L., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J., Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 1996. Vol. 6. P. 325–330.
16. Ow D., Jacobs J., Howell S. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987. Vol. 84. P. 4870–4874.
17. Guilley H., Dudley R., Jonard G., Balázs E., Richards, K., Transcription of Cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell.* 1982. Vol. 30. P. 763–773.
18. Kay R., Chan A., Daly M., McPherson J. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science.* 1987. Vol. 236. P. 1299–1302.
19. Dedonder A., Rethy R., Fredericq H., Van Montagu M., Krebbers E. Arabidopsis *rbcS* genes are differentially regulated by light. *Plant Physiol.* 1993. Vol. 101. P. 801–808.
20. McGrath J., Terzaghi W., Sridhar P., Cashmore A., Pichersky E. Sequence of the fourth and fifth Photosystem II type I chlorophyll *a/b*-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family. *Plant Mol. Biol.* 1992. Vol. 19. P. 725–733.
21. Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W., Turner P.C., Wilson T.M. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 1987. Vol. 15. P. 3257–3273.
22. Making Calcium Competent Cells. URL: [http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/protocols/calcium\\_comp\\_cells.pdf](http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/protocols/calcium_comp_cells.pdf) (Last accessed: 5.04.2019).
23. Froger A., Hall J.E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments: JoVE.* 2007. Vol. 6.
24. Lerner C.G., Inouye M. Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. *Nucleic acids research.* 1990. Vol. 18, № 15. P. 4631.
25. Lezin G., Kosaka Y., Yost H.J., Kuehn M.R., Brunelli L. A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 8. P. 23457.
26. URL: <http://sites.bio.indiana.edu/~pikaardlab/PDFs%20and%20protocol%20files%20/agrotransform.html> (Last accessed: 1.04.2019).
27. Bendandi M., Marillonnet S., Kandzia R., Thieme F., Nickstadt A., Herz S., Frode R., Inoges S., Lopez-Diaz de Cerio A., Soria, E., Villanueva H., Vancanneyt G., McCormick A., Tuse D., Lenz J., Butler-Ransohoff J.E., Klimyuk V., Gleba Y. Rapid, high-yield production in plants of individualized idiotypic vaccines for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* 2010. Vol. 21. P. 2420–2427.

28. Tuse, D. *et al.* Clinical Safety and Immunogenicity of Tumor-Targeted, Plant-Made Id-KLH Conjugate Vaccines for Follicular Lymphoma. *BioMed. Res. Int.* 2015. P. 648143.
29. Werner S., Breus O., Symonenko Y., Marillonnet S., Gleba Y. High-level recombinant protein expression in transgenic plants by using a double-inducible viral vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. Vol. 108, № 34. P. 14061–14066.
30. Hahn S., Giritch A., Bartels D., Bortesi L., Gleba Y. A novel and fully scalable *Agrobacterium* spray-based process for manufacturing cellulases and other costsensitive proteins in plants. *Plant Biotechnol J.* 2015. Vol. 13, № 5. P. 708–716.
31. Schulz S., Stephan A., Hahn S., Bortesi L., Jarczowski F., Bettmann U. *et al.* Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015. Vol. 112. P. E5454–5460.

**VARCHENKO O. I.<sup>1, 2</sup>, KRASYUK B. M.<sup>1, 4</sup>, FEDCHUNOV A. A.<sup>2</sup>, ZIMINA O. V.<sup>2, 3</sup>, PARIJ M. F.<sup>2</sup>, SYMONENKO Yu. V.<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148 b, e-mail: okvarchenko@gmail.com*

<sup>2</sup>*Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding (VNIS), Ukraine, 03022, Kyiv, Vasykivska str., 30*

<sup>3</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150*

<sup>4</sup>*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroiv Oborony str., 15*

#### **GENETIC CONSTRUCTS CREATION USING GOLDEN GATE CLONING METHOD**

**Aim.** Creation of genetic constructions to study the effects of various regulatory elements, namely promoters, on the expression of GFP reporter protein. **Methods.** For creation genetic constructs, the method of molecular cloning Golden Gate was used, which allows the rapid creation of genetic vectors using IIS type restriction enzymes and T4 DNA ligases. **Results.** For research six different promoters were selected, namely the 35S CaMV (Cauliflower Mosaic Virus), double 35S CaMV promoter, promoters of the RbcS2B and RbcS1B genes encoding a small subunit of ribulobisphosphate carboxylase (RuBisCo) isolated from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; promoters of genes encoding chlorophyll a-b binding proteins (LHB1B1 and LHB1B2) also isolated from *A. thaliana* (L.) Heynh. All transcription units additionally contained the following elements: the 5'-untranslated region  $\Omega$  sequence (5'UTR  $\Omega$ ) from the tobacco mosaic virus TMV (Tobacco Mosaic Virus); the coding sequence of the gene *gfp* (Green Fluorescent Protein) isolated from *A. victoria* and the 35S Terminator CaMV with the polyadenylation signal and the 3'-untranslated region sequence. As a result, six genetic constructs with different regulatory elements, namely promoters, have been created. **Conclusions.** To study the effects of various regulatory elements, namely promoters, on the expression of a GFP reporter protein in transient or stable genetic transformation of plants the created genetic constructs can be used.

**Keywords:** cloning, genetic constructs, promoters, Green Fluorescent Protein (GFP).