

УДК: 577.218:577.29

## АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ РОБОТИ СИСТЕМИ САЙТ-СПЕЦИФІЧНОЇ РЕКОМБІНАЦІЇ *Cre/LoxP* ВПРОДОВЖ ДЕКІЛЬКОХ ПОКОЛІНЬ ТРАНСФОРМАНТІВ *ARABIDOPSIS THALIANA*

А.С. СЕКАН

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України  
 Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а  
 e-mail: ehirta3@gmail.com

**Мета.** Проаналізувати ефективність роботи сайт-специфічної рекомбінаційної системи *Cre/LoxP* протягом декількох поколінь трансформантів *Arabidopsis thaliana*. **Методи.** Досліджували пріріст трансформантів *Arabidopsis thaliana* вільних від селективних маркерних генів впродовж декількох поколінь. Генетичну трансформацію рослин здійснювали згідно нового підходу до використання сайт-специфічної рекомбінаційної системи *Cre/LoxP* під контролем 35S промотору. З цією метою були розроблені два варіанти ДНК-конструкції, що містили маркерний ген *gus* та ген рекомбінази *cre*, які обмежувались сайтами екцизії *loxP*. Ген стійкості до гігроміцину *hptII* в обох конструкціях виносився за межі сайтів *loxP* і в разі здійснення події екцизії залишався в геномі рослин. Селекцію трансформантів проводили на середовищі Мурасіге та Скуга із додаванням гігроміцину (100 мг/л). Подію рекомбінаційної екцизії маркерних генів у геномі визначали за допомогою гістохімічного аналізу та молекулярно-генетичного аналізу впродовж трьох поколінь трансформантів. **Результати.** Встановлено, що кількість трансформантів, які не містять маркерних генів, збільшується з кожним наступним поколінням незалежно від варіанта трансформуючої конструкції. Під час проведення молекулярно-генетичного аналізу було виявлено зведення кількості інтегрованої Т-ДНК на геном до мінімуму, що вказує на здатність сайт-специфічної рекомбінаційної системи *Cre/LoxP* контролювати кількість подій інтеграції у геномі рослини. **Висновки.** Запропонований підхід є досить простим у використанні та є гарною можливістю отримання трансформованих рослин, вільних від маркерних послідовностей в геномі.

**Ключові слова:** селективні маркерні гени, видалення маркерних послідовностей, сайт-специфічна рекомбіназа.

**Вступ.** Використання селективних та маркерних генів (СМГ), а також селективних агентів є важливим елементом генетичної трансформації рослин. Після завершення процесу отримання трансформантів гени стійкості до антибіотиків чи гербіцидів залишаються в геномі рослин, отож їхня присутність у генетично модифікованих (ГМ) рослинах з подальшим потраплянням їх в харчовий раціон людини або ж тварин викликає ряд запитань з боку громадськості та часто вимагає додаткового державного контролю. Також під час комерціалізації ГМ рослин та вивільнення їх у навколишнє середовище виникає загроза потрапляння СМГ від трансформантів до дикоростучих родичів. Саме тому з метою уникнення присутності маркерних та селективних генів у геномі трансформантів розроблено декілька стратегій [1]. Серед них найпопулярнішими є транспозон-опосередковане позиціонування генів інтересу відносно геному [2], ко-трансформація та сегрегація маркерних генів [3], інтрахромосомальна гомологічна рекомбінація між двома гомологічними послідовностями [4] та використання декількох сайт-специфічних екцизійних систем ДНК, таких як *Cre/LoxP*, виділеної з бактеріофагу P1 [5], *Flp/frt*, виділеної з *Saccharomyces cerevisiae* [6], *R/RS* виділена з *Zygosaccharomyces rouxii* [7] та *Gin/gix* із бактеріофага Mu [8].

© А.С. СЕКАН, 2015

Сайт-специфічна рекомбінація є процесом реципрокних змін між специфічними ділянками ДНК, що каталізуються рекомбіназою. Рекомбінази можуть змінювати послідовність ДНК із досить високою специфічністю, що дає можливість використовувати цю систему як молекулярний інструмент для генетичних маніпуляцій [5]. Під час роботи фермент розпізнає та здійснює рекомбінацію і видалення ДНК між двома прямонаправленими асиметричними повторами *loxP* довжиною 34 п.н. Найбільш охарактеризованою серед сайт-специфічних рекомбіназних систем є *Cre/loxP* [9]. У ряді робіт вже описано використання цієї системи для видалення СМГ з геному трансформантів. Згідно одного підходу рослини, попередньо трансформовані конструкцією з маркерним геном, що фланкується сайтами ексцизиї *loxP*, повторно трансформують плазмідом з геном рекомбінази *Cre*. Подія видалення в такому випадку відбувається у наступних поколіннях трансформантів [5].

Рекомбіназа також може бути вбудована в одну конструкцію разом із сайтами ексцизиї, що фланкують маркерний ген. У таких випадках Т-ДНК може бути поставленою під контроль хімічно-індукбельних промоторів [10], або ж промоторів теплового шоку [11]. Застосування конститутивного промотору 35S дозволяє спростити використання векторної конструкції. Послідовності 35S промотору та *nos* термінатора є надійною регулюючою системою для контролю експресії Т-ДНК у рослинному геномі. У роботі Kim et al. [12] для трансформації арабідопсису за допомогою векторної конструкції з сайт-специфічною рекомбіназою *Cre/loxP* використовували регуляторні послідовності промотора 35S та *nos* термінатора. Послідовність маркерного гена *gus* розділялась та виносилась за межі сайтів ексцизиї *loxP*. Під час події видалення ділянки ДНК, обмеженої сайтами, частини гена з'єднувались. Таким чином, наявність експресії гена *gus* свідчила про роботу ферменту. Однак при застосуванні такого підходу для отримання трансформантів, вільних від СМГ, відкритим залишається питання подальшої присутності маркерного гена у рослинному геномі. Також в результаті роз'єднання кодуєчої послідовності ДНК підвищується ймовірність виникнення ефекту мовчання генів.

З метою отримання генетично модифікованих рослин, вільних від маркерних генів (МГ), нами роз-

роблено новий підхід до використання сайт-специфічної рекомбіназної системи *Cre/loxP* під контролем 35S промотору та термінатора *nos* [13, 14]. Для трансформації рослин *Arabidopsis thaliana* сконструйовано декілька типів векторних конструкцій з метою визначення ефективності трансформації рослин кожним із варіантів [13]. Усі маркерні гени разом із геном рекомбінази *Cre* були розташовані в межах сайтів ексцизиї *loxP*. Тому, коли відбувалась подія рекомбіназної ексцизиї, видаленню підлягали як МГ, так і ген *cre*. У результаті в геномі трансформанта має залишитись лише ген інтересу. Запропонований підхід дозволяє здійснювати швидко та ефективно трансформацію рослини, не потребуючи при цьому присутності додаткових агентів чи специфічних умов зовнішнього середовища [14]. У зв'язку з цим метою нашої нинішньої роботи було проаналізувати ефективність роботи сайт-специфічної рекомбіназної системи *Cre/loxP* протягом декількох поколінь трансформантів *Arabidopsis thaliana*.

### Матеріали і методи

Як рослинний матеріал використовували дикий тип *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia. Генетичну трансформацію попередньо було здійснено за допомогою методу квіткового занурення в агробактеріальну суспензію [15]. Для визначення оптимального дизайну використовували два варіанти векторної конструкції: pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC (*Cre/loxP* 1 *Cre/loxP* 2) [13]. Різниця між конструкціями полягала лише в порядку розташування генів у трансформуючій касеті. Позитивним контролем слугувала векторна конструкція, що не містила гена *cre* та сайтів ексцизиї. Обидві ДНК-конструкції мали такі послідовності, як ген рекомбінази *cre*, репортерний ген *gus*, ген *nptII*, обмежених сайтами ексцизиї *loxP*. Ген стійкості до гігроміцину *hptII* в обох конструкціях був винесений за межі сайтів *loxP* і у випадку здійснення події ексцизиї залишався в геномі рослини. Усі гени у конструкціях знаходились під контролем 35S промотору та термінуючої послідовності, 3' фланкуючої ділянки гена нопалінсинтази (*nos*) (рис. 1). За допомогою методу електропорації плазмідами [16] pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC трансформували бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (штам GV3101).

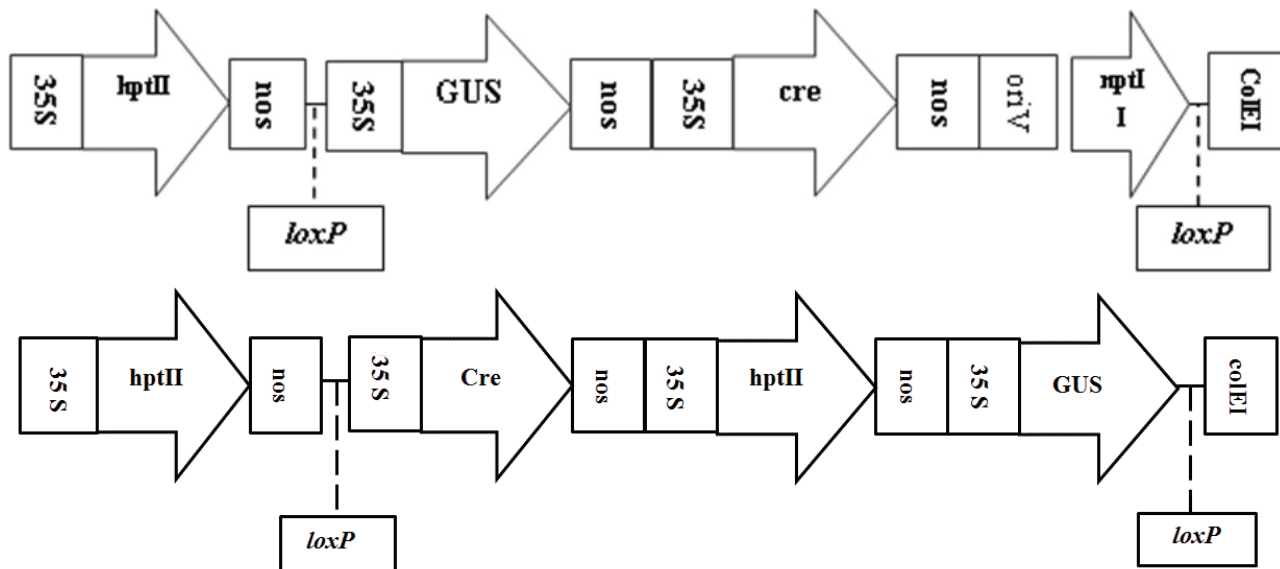


Рис. 1. Схема розташування генів у ДНК-конструкціях Cre/loxP 1 та Cre/loxP 2. До складу конструкцій входить: 35S-промотор, ген *hptII*, *nos*-термінатор, GUS – ген глюкуронідази, *cre* – ген рекомбінази, *oriV* – сайт початку ініціації реплікації, ген *nptII*, *ColEI* – послідовність, що відповідає за реплікацію плазмід в бактеріях *E. coli* [13]

Для трансформації суспензії *A. tumefaciens* вирощували в рідкому середовищі Лурія-Бертані [17] у присутності гігromіцину (100 мг/л) впродовж 48 год при 28 °C на орбітальному шейкері (180 об/хв). Культуру бактерій осаджували при 4000 об/хв протягом 5 хв та суспендували в розчині солей Мурасіге та Скуга («Sigma», США), 5 % сахарози, MES («Sigma», США) та манітолу («Sigma», США). Щільність суспензії при оптичній густині 600 нм становила 0,8. Інокуляцію здійснювали шляхом занурення квіткових бруньок та квіток у бактеріальну суспензію на 1–2 хв. Рослини спочатку інкубували 12 год у темряві за умов підвищеної вологості та вирощували протягом чотирьох тижнів за тепличних умов до моменту дозрівання насінневого матеріалу. Для подальшої роботи насіння (покоління T<sub>0</sub>) стерилізували за допомогою вакуумної обробки з додаванням до ексикатору суміші гіпохлориту натрію та 1 М соляної кислоти у співвідношенні 3:1, протягом 4 год і пророщували на селективному середовищі Мурасіге і Скуга [18] у присутності гігromіцину (100 мг/л). Для подальшої роботи відбирали лише рослини, стійкі до гігromіцину.

Для виявлення експресії маркерного гена проводили гістохімічний аналіз за допомогою GUS-тесту на 10–12-денних проростках. Для аналізу відбирали по 8 зразків кожної лінії трансформантів.

Рослинний матеріал інкубували в реакційній суміші з 0,2 М фосфатом натрію, pH 7, 10 мМ ЕДТА, 20 % метанолом, 0,01 % Triton X-100, 2 % ДМСО та 0,1 % 5-бром-4-хлор-3-індол β-глюкопіранозидом (X-Gluc) при температурі 37 °C протягом 2–3 год [19]. Після інкубації тканини промивали у 70 %-ному спирті для руйнування хлорофілу.

З метою підтвердження результатів GUS-тесту покоління T<sub>0</sub> здійснювали молекулярно-генетичний аналіз. Для цього виділяли геномну ДНК із двохтижневих рослин [20] та проводили ПЛР: змішували 2 мкл розчиненої ДНК, 10 мкМ праймерів (в об'ємі 0,5 мкл), 250 мкМ суміші дНТФ, 250 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3 одиниці Taq-полімерази («Sigma», США) та десятикратний розчин буфера ПЛР («Sigma», США) до кінцевого об'єму 25 мкл. Для ампліфікації ДНК використовували праймери: *hptII*F2 (відпал до 3'-кінця гена *hptII*) 5'-CACAGTTCTCGTCCACAGTTTCG-3' і 35StermRevAvrII (олігопослідовність, комплементарна 3'-кінцю 35S промотору) 5'-aaacSTAGGGATCTGGATTTAGTACTGG-3'. Розмір продуктів ампліфікації становив 300 п.н. Наявність продуктів ампліфікації за цією парою праймерів мав свідчити про присутність T-ДНК у геномі.

Подію ексцизиї за допомогою рекомбінази Cre *loxP*-обмежених ділянок визначали, використовуючи іншу пару праймерів в аналогічній

суміші ПЛР: pRI-vecprobe1 (послідовність, комплементарна до векторної послідовності pORE) 5'-CACTCGATACAGGC AGCCCA-3' та pRI-vecprobe2 5'-GAATCTTGCCTGCACG AATACC-3'. Розмір продуктів ампліфікації становив 1800 п.н. Обидві реакції проводили за умов: початкова денатурація при температурі 94 °C - 2 хв; ампліфікація – 30 циклів (92 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 90 с), кінцева елонгація – 72 °C протягом 5 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 2 %-ному агарозному гелі з додаванням бромистого етидію [13].

Надалі трансформанти покоління  $T_0$  переносили до ґрунту та вирощували за тепличних умов до моменту дозрівання насіння. Зібране від кожного трансформанта насіння вважалось окремою лінією (покоління  $T_1$ ). Для аналізу стабільності трансформації досліджували зразки з 60 ліній арабідопсису, трансформованих кожним варіантом векторної конструкції. Стерилізацію та пророщування насіння здійснювали за протоколом, описаним вище. Насіння пророщували за умов розсіяного світла при температурі 24–26 °C з 16-годинним фотоперіодом протягом 10–12 днів. Після цього підраховували кількість чутливих та стійких до селективного агента проростків кожної з ліній для визначення ефективності події трансформації.

Для виявлення подій ексцизії у рослин покоління  $T_1$  та визначення роботи системи Cre/loxP у межах кожної з ДНК-конструкцій в проростках на етапі селективного середовища проводили гістохімічний аналіз на GUS-активність за методикою, описаною вище. Спочатку відбирали стійкі до антибіотика проростки (по 8 зразків з кожної лінії). З метою уникнення ефекту сайленсингу на етапі селективного середовища трансформанти переносили у ґрунт. Для цього відбирали лінії лише з негативним або частково негативним результатом GUS-тесту. Відібрані рослини (по 8 зразків з кожної лінії) вирощували за тепличних умов протягом 21–28 діб у відповідному ґрунті. Після цього на етапі росту рослин у ґрунті здійснювали повторний гістохімічний аналіз рослинних тканин на GUS-активність. З метою підтвердження результатів GUS-тесту проводили ПЛР-аналіз за методикою, описаним вище [14].

Для оцінки достовірності отриманих результатів та визначення ефективності застосування ро-

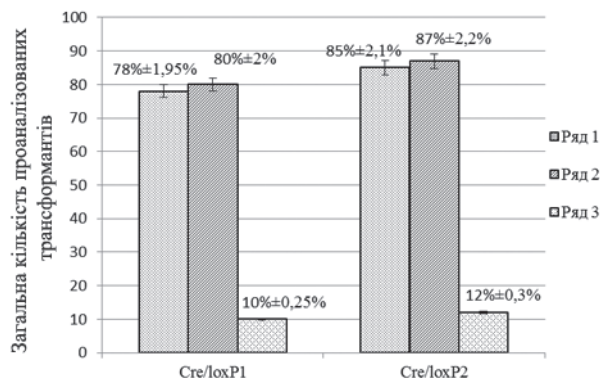
зробленого підходу отримання рослин, вільних від маркерних послідовностей, здійснювали повторний гістохімічний та молекулярно-генетичний аналіз покоління трансформантів  $T_2$  за схемою, описаною для покоління  $T_1$ . Для статистичної обробки використовували програму Microsoft Excel. Різницю між двома середніми величинами вважали вірогідною при  $p < 0,05$  [21]. Критерій (середнє арифметичне) визначали при розщепленні в усіх трьох поколіннях.

### Результати та обговорення

Під час експерименту з генетичної трансформації арабідопсису за допомогою квіткового занурення з використанням двох варіантів ДНК-конструкції вдалось отримати досить велику кількість трансформантів. Подію трансформації встановлювали за схожістю насінневого матеріалу на селективному середовищі з гігromіцином (100 мг/л). Трансформанти, пророщені за умов *in vitro*, не виявляли відмінностей за темпом росту, укорінення та у розмірах порівняно з нетрансформованими рослинами.

Для подальших досліджень відібрали по 60 проростків, трансформованих кожним варіантом конструкції. Трансформанти переносили до ґрунту, вирощували за тепличних умов. При цьому у відібраних зразків не було виявлено фенотипових відмінностей порівняно з рослинами дикого типу. З метою підтвердження події трансформації проводили гістохімічний аналіз для встановлення експресії привнесених генів у рослинах. Вважали, що оскільки послідовність маркерного гена *gus* та ферменту розташовані в межах сайтів ексцизії та під контролем одного промотору, рівень експресії цих білків знаходиться на однаковому рівні. Із проаналізованих рослин, трансформованих векторною конструкцією Cre/loxP1 забарвлення за GUS-тестом відбулось у 78 % зразків. Для трансформантів за конструкцією Cre/loxP2 забарвлення за GUS-тестом відбулось у 85 % досліджених зразків.

З метою уникнення ефекту мовчання генів, підтвердження присутності T-ДНК у геномі трансформантів та виявлення можливої події рекомбіназної ексцизії в трансформантах  $T_0$  проводили молекулярно-генетичний аналіз за допомогою ПЛР. Для встановлення присутності T-ДНК використовували пару праймерів, комплементарну до ділянки гена



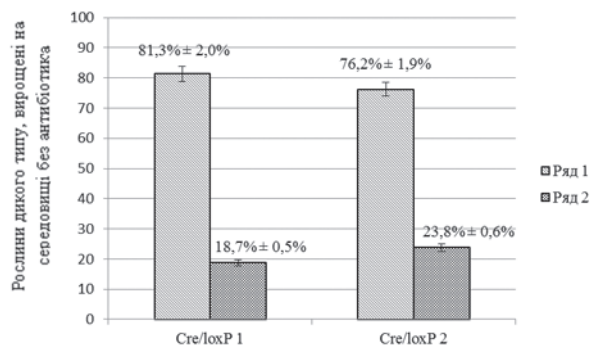
**Рис. 2.** Порівняння результатів гістохімічного та молекулярно-генетичного аналізів трансформованих рослин арабідопсису покоління  $T_0$  за допомогою векторних конструкцій pORE-lox1HGС та pORE-lox2HGС: ряд 1 – експресія гена *gus*; ряд 2 – ПЛР-детекція Т-ДНК у геномі; ряд 3 – подія видалення СМГ рекомбіназою Cre

стійкості до гігromіцину *hptII*, що знаходиться поза межами ексцизії. Для виявлення подій видалення, використовували пару праймерів, комплементарну ділянці ДНК у межах сайтів ексцизії. У результаті аналізу ПЛР трансформантів покоління  $T_0$  виявлено присутність Т-ДНК конструкцією Cre/loxP1 у 80 % рослин, а у трансформантів за конструкцією Cre/loxP2 – у 87 %. Подію ексцизії на даному етапі досліджень виявлено у 10 % рослин за Cre/loxP1 та у 12 % за Cre/loxP2 (рис. 2). Різниця між отриманими результатами гістохімічного та молекулярно-генетичного аналізу може свідчити на користь мовчання генів.

Насіння (трансформанти покоління  $T_1$ ) збирали та стерилізували за попередньою схемою, пророщували *in vitro* на селективному середовищі з гігromіцином. Під час пророщування кожної лінії трансформантів насінин з ознакою стерильності майже не виявляли. В результаті встановлено, що кількість ліній трансформантів для обох типів конструкцій ДНК та стійких до антибіотика в поколінні  $T_1$  є високою [19]. Це свідчить про експресію привнесених генів у наступному поколінні рослин. Відсоток стійких і чутливих до селективного агента рослин підраховували окремо для кожної лінії трансформантів, в обсязі 60–70 проростків на лінію. Відсоток рослин, трансформованих конструкцією Cre/loxP1 та стійких до селективного агента, виявився вищим порівняно з рослинами, трансформованими ДНК конструкцією Cre/loxP2.

Загальний відсоток рослин стійких до антибіотика, трансформованих конструкцією Cre/loxP1, становив 81,3 %, а рослин, трансформованих конструкцією Cre/loxP2 – 76,2 % (рис. 3).

Експресію Т-ДНК у геномі трансформантів покоління  $T_1$ , як і у випадку попереднього покоління, визначали за допомогою гістохімічного аналізу [22]. Отримані результати GUS-тесту трансгенних ліній арабідопсису поділили на три групи (рис. 4): перша – лінії, з позитивним результатом GUS-тесту (рослини забарвлювались повністю); друга – лінії, в яких були присутні проростки з позитивним і негативним результатами GUS-тесту; третя – лінії з негативним результатом GUS-тесту. Для позитивного контролю використовували рослини арабідопсису, трансформовані конструкцією, яка не містила сайт-специфічної системи Cre/loxP. За результатами GUS-тесту було з'ясовано, що приблизно 25 % досліджуваних ліній, трансформованих ДНК-конструкцією Cre/loxP1, є вільними від маркерних послідовностей, а у 12 % ліній GUS-забарвлення могло бути як позитивним, так і бути відсутнім. У лініях, трансформованих ДНК-конструкцією Cre/loxP2, відбулась автоексцизія в 15 % від загальної кількості протестованих ліній. Кількість ліній з GUS-позитивною та GUS-негативною реакцією становила 13 %. За результатами попереднього гістохімічного аналізу, проведеного на рослинах покоління  $T_0$ , виявлено приріст ліній з негативним результатом GUS-тесту приблизно на 5–7 % для кожного типу ДНК-конструкції, що свідчить про ро-



**Рис. 3.** Середнє співвідношення резистентних та чутливих до антибіотика рослин для кожної лінії покоління  $T_1$  з векторними конструкціями Cre/loxP 1 та Cre/loxP 2: ряд 1 – відсоток рослин, стійких до антибіотика; ряд 2 – відсоток рослин, чутливих до антибіотика [14]

боту рекомбінази і в наступних поколіннях трансформантів [22].

Проростки ліній з негативним або частково негативним результатом GUS-тесту надалі були висаджені у ґрунт для уникнення ефекту мовчання генів під час пророщування трансформантів на селективному середовищі. Після зростання рослин у ґрунті протягом 21–28 діб здійснювали повторний гістохімічний аналіз рослинних тканин на GUS-активність за схемою попереднього покоління. Розбіжностей між двома повторами GUS-тесту не спостерігали.

Для підтвердження події трансформації та виявлення рекомбіназної ексцизії у покоління  $T_1$  проводили ПЛР-аналіз геномної ДНК, як і випадку дослідження попереднього покоління. Розбіжностей між результатами ПЛР-аналізу та гістохімічного аналізу не спостерігали, що свідчить про відсутність ефекту мовчання генів у трансформантах покоління  $T_1$ . У результаті молекулярно-генетичного та гістохімічного аналізу покоління  $T_1$  виявлено збільшення кількості трансгенних ліній із химерно забарвленими рослинами порівняно з поколінням  $T_0$ . Кількість ліній із зразками, в геномі яких відбулось видалення МГ (не спостерігали забарвлення за GUS-тестом), також зростала, що було підтверджено за допомогою ПЛР.

Для порівняння, у роботі Chong-Pérez *et al.* [23] для отримання трансформованих рослин банану, вільних від МГ, у векторних конструкціях використовували сайт-специфічну рекомбіназну систему Cre/loxP під контролем індукцибельних промоторів теплового шоку Gmhsp17.6-L та HSP18.2. Індукція експресії рекомбінази в рослинах, трансформованих тією чи іншою конструкцією, відбувалась за умов теплового шоку. В результаті частота видалення loxP-обмежених ділянок була визначена як 59,7 % та 40 % відповідно. У роботі Zuo *et al.* [10] для трансформації рослин арабідопсису використовували рекомбіназну систему Cre/loxP під контролем промотору естрогенового рецептора та в межах спеціально сконструйованої системи XVE. Ексцизія ділянок ДНК, обмежених сайтами ексцизії, відбувалась у присутності β-естрадіолу. Подія ексцизії була встановлена у 66 %.

Молекулярно-генетичний та гістохімічний аналіз покоління трансформантів  $T_2$  здійснювали за схемою, також аналогічною для двох поперед-

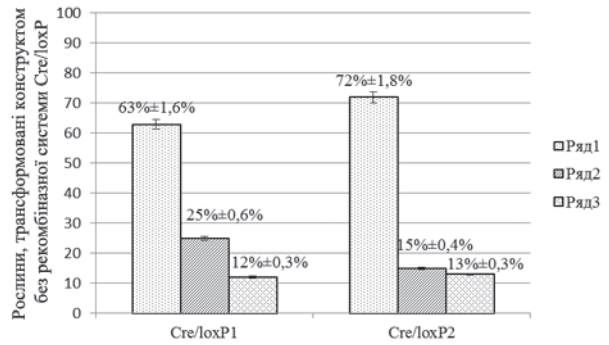


Рис. 4. Середнє співвідношення між: ряд 1 – лініями з GUS-позитивно забарвленими зразками; ряд 2 – лініями з негативною реакцією на GUS та ряд 3 – лініями із неоднорідно забарвленими зразками (покоління трансформантів  $T_1$ )

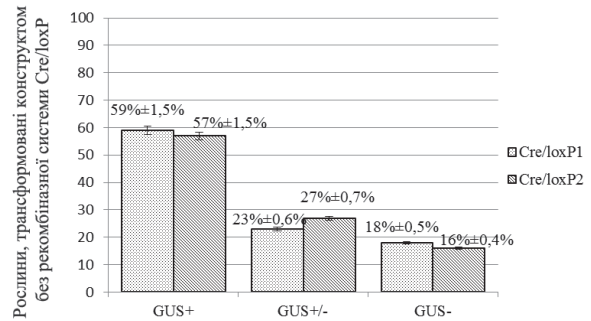


Рис. 5. Середнє співвідношення результатів GUS-тесту між лініями трансгенів, покоління  $T_2$ : GUS+ – лінії з повністю забарвленими зразками; GUS+/- – лінії з неоднорідно забарвленими зразками, або зразками із видаленими СМГ, що детектовано за допомогою ПЛР; GUS- – лінії із зразками, де повністю відбулась ексцизія СМГ

ніх поколінь. У результаті проведених досліджень між трансформантами виявлено розщеплення 3:1 за характером забарвлення їхніх тканин (рис. 5).

Внаслідок гістохімічного аналізу рослин покоління  $T_2$  виявлено збільшення кількості трансгенних ліній з химерним забарвленням. Кількість ліній, в геномі яких відбулось видалення МГ, також зроста, що було підтверджено за допомогою ПЛР. Виявлено, що видалення маркерних послідовностей відбувається успішно, незалежно від типу трансформуючої конструкції. При порівнянні результатів видалення МГ у досліджуваних рослинах протягом трьох поколінь виявили, що кількість ліній, трансформованих конструктором Cre/loxP 1 та вільних від маркерних послідовностей, є вищою (53 % від загальної кількості проаналізованих ліній) порівняно з кількістю ліній рослин, транс-

формованих конструктором Cre/loxP 2 та вільних від МГ (43 % від загальної кількості проаналізованих ліній). Різницю результатів у даному випадку можна пояснити різним дизайном використаних ДНК-конструктів. Окрім цього виявили появу або зростання кількості негативно-зabarвлених зразків за GUS-тестом у межах окремих ліній. В основному появу GUS-негативних зразків спостерігали в лінях, що раніше були відмічені як химерні. Таким чином можна зробити висновок, що з кожним наступним поколінням кількість рослин або ліній трансформантів, вільних від маркерних та селективних генів, зростає.

### Висновки

У результаті проведеної роботи отримано трансформанти арабідопсису, що містили у своєму геномі сайт-специфічну рекомбіназну систему Cre/loxP. Метою даної роботи був аналіз ефективності використання даної системи для рослин, вільних від маркерних послідовностей впродовж декількох поколінь трансформантів. За допомогою гістохімічного та молекулярно-генетичного аналізу нам вдалось виявити події видалення МГ вже у першому поколінні рослин. Показано, що з кожним наступним поколінням кількість трансформантів, вільних від маркерних генів зростає не зважаючи, за яким конструктором відбулась генетична трансформація. Запропонований підхід із застосування рекомбіназної системи Cre/loxP знаходиться під контролем конститутивного промотору 35S. Це значно спрощує процес отримання трансформантів і є альтернативою до вже описаних раніше підходів, які вимагають створення специфічних умов зовнішнього середовища, присутності додаткових хімічних агентів, або ж знаходяться під контролем тканино-специфічних промоторів. Даний підхід є досить простим для використання і є гарною можливістю отримання трансформованих рослин, вільних від маркерних послідовностей в геномі.

### Перелік літератури

1. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Endo S., Yamada K., Komamine A. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker // *Plant Cell Rep.* – 2001. – Vol. 20. – P. 383–392.
2. Cotsaftis O., Sallaud C., Breitel J.C., Meynard D., Greco R. et al. Transposon-mediated generation of T-DNA- and marker-free rice

- plants expressing a *Bt* endotoxin gene // *Mol. Breed.* – 2002. – Vol. 10. – P. 165–180.
3. Daley M., Knauf V., Summerfelt K.R., Turner J.C. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants // *Plant Cell Rep.* – 1998. – Vol. 17. – P. 489–496.
4. Zubko E., Scutt C., Meyer P. Intrachromosomal recombination between *attP* regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 442–445.
5. Hoa T.T.C., Bong B.B., Huq E., Hodges T.K. Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – Vol. 104. – P. 518–525.
6. Lloyd A.M., Davis R.W. Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum* // *Mol. Gen. Genet.* – 1994. – Vol. 242. – P. 653–657.
7. Endo S., Sujita K., Sakai M., Tanaka H., Ebinuma H. Single step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system // *Plant J.* – 2002. – Vol. 30. – P. 115–122.
8. Maeser S., Kahmann R. The *Gin* recombinase of phage Mu can catalyze site-specific recombination in plant protoplasts // *Mol. Gen. Genet.* – 1991. – Vol. 230. – P. 170–176.
9. Grindley N.D.F., Whiteson K.L., Rice P.A. Mechanisms of site-specific recombination // *Annu. Rev. Biochem.* – 2006. – Vol. 75. – P. 567–605.
10. Zuo J., Niu Q.W., Moller S.G., Chua N.H. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants // *Nat. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 157–161.
11. Hoff T., Schnorr K.M., Mundy J. A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants // *Plant Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 45. – P. 41–49.
12. Kim H.-B., Cho J.-I., Ryou N., et al. Development of a simple and efficient system for excision selectable markers in *Arabidopsis* using a minimal promoter::Cre fusion construct // *Mol. Cells.* – 2012. – Vol. 33, № 1. – P. 61 – 69.
13. Секан А.С., Ісаєнков С.В. Створення конструкцій з сайт-специфічною рекомбіназною системою Cre/loxP під контролем 35S промотору та їх використання для отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей // Наукові доп. НУБіП. – 2014. – № 5 (47). – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd\\_2014\\_5\\_3.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd_2014_5_3.pdf).
14. Секан А.С., Ісаєнков С.В. Ефективність трансформації *Arabidopsis thaliana* ДНК-конструкціями з рекомбіназною системою Cre/loxP // *Biotech Acta.* – 2015. – Vol. 8, № – P. 48 – 55.
15. Секан А.С., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP для отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 15. – С. 128 – 133.
16. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* – N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. – 2100 p.
17. Маниатис Т. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.* / Т. Маниатис, Е.Ф. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 521 с.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473 – 497.
19. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1987. – Vol. 5. – P. 387–405.

20. Dellaporta S. L. A plant DNA miniprep: version II // Plant Mol. Biol. Rep. – 1983. – Vol. 1. – P. 19–21.
21. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
22. Секан А.С., Ісаєнко С.В. Одноетапне отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей, за допомогою сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP під контролем мінімального 35S промотору // Доп. НАН України. – 2014. – Т. 3. – С. 158 – 163.
23. Chong-Perez B., Kosky R.G., Reyers M. Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system // J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 159, № 4. – P. 265 – 273.

Представлено Б.В. Моргуном  
Надійшла 01.04.2015

### АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ СИСТЕМЫ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ CRE/LOXP НА ПРОТЯЖЕНИИ НЕСКОЛЬКИХ ПОКОЛЕНИЙ ТРАНСФОРМАНТОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*

А.С. Секан

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины  
Украина, 04123, Киев, ул. Осиповского, 2а  
e-mail: ehirta3@gmail.com

**Цель.** Проанализировать эффективность работы сайт-специфической рекомбиназной системы Cre/loxP на протяжении нескольких поколений трансформантов *Arabidopsis thaliana*. **Методы.** Исследовали прирост трансформантов *Arabidopsis thaliana* свободных от селективных маркерных генов на протяжении нескольких поколений. Генетическая трансформация растений осуществлялась согласно новому подходу в использовании сайт-специфической рекомбиназной системы Cre/loxP под контролем 35S промотора. С этой целью были разработаны два варианта ДНК-конструкции, которые имели маркерный ген *gus* и ген рекомбиназы *cre* и были ограничены сайтами эксцизии *loxP*. Ген устойчивости к гигромицину *hptII* в обеих конструкциях выносился за границы сайтов *loxP* и в случае события эксцизии оставался в геноме растений. Селекцию трансформантов проводили на среде Мурасиге и Скуга с добавлением гигромицина (100 мг/л). Событие рекомбиназной эксцизии маркерных генов в геноме устанавливали с помощью гистохимического анализа и молекулярно-генетического анализа на протяжении трех поколений трансформантов. **Результаты.** Установлено, что количество трансформантов, которые не несут маркерных генов, увеличивается с каждым последующим поколением независимо от варианта трансформирующей конструкции. Во время проведения молекулярно-генетического анализа было установлено уменьшение количества интегрированной Т-ДНК на геном до миниму-

ма, что указывает на способность сайт-специфической рекомбиназной системы Cre/loxP контролировать количество событий интеграции в геноме растений. **Выводы.** Предложенный подход является достаточно простым в использовании и есть хорошей возможностью получения трансформированных растений, свободных от маркерных последовательностей в геноме.

**Ключевые слова:** селективные маркерные гены, удаление маркерных последовательностей, сайт-специфическая рекомбиназа.

### ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF THE CRE/LOXP SITE-SPECIFIC RECOMBINASE SYSTEM THROUGH SUBSEQUENT GENERATIONS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* TRANSFORMANTS

A.S. Sekan

SO «Institute of food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine»  
Ukraine, 04123, Kiev, Osipovskogo st., 2a  
e-mail: ehirta3@gmail.com

**Aim.** The aim of the work was to analyze the effectiveness of the Cre/loxP site-specific recombinase system through subsequent generations of *Arabidopsis thaliana* transformants. **Methods.** The increase in the number of marker-free *Arabidopsis thaliana* transformants was studied through several subsequent generations. Genetic transformation of plants was carried out using the Cre/loxP site-specific recombinase system under the control of 35S promoter. For this purpose two types of DNA constructs were designed that contain the marker gene *gus* and the recombinase gene *cre* flanked by *loxP* sites. Hygromycin resistance gene *hptII* in both constructs was moved out of the *loxP* sites, and in the case of excision event it remained in plant genome. The selection of transformants was performed on Murashige and Scoog medium with hygromycine (100 mg/l). The recombinase-mediated excision event of marker genes in genome was determined by histochemical analysis and molecular genetic analysis of three subsequent generations of transformants. **Results.** The number of marker-free transformants was increased with each subsequent generation for both types of DNA-constructs. Moreover, the reduction in the total amount of integrated T-DNA per genome to a minimum was identified by molecular-genetic analysis that indicates the ability of the Cre/loxP site-specific recombinase system to control the number of the integration events in plant genome. **Conclusions.** The developed approach is simple in usage and effective tool for obtaining marker-free transformed plants.

**Keywords:** selective marker genes, removal of marker genes, site-specific recombinase.