

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

1 (307)

**ҚАҢТАР – АҚПАН 2015 ж.
ЯНВАРЬ – ФЕВРАЛЬ 2015 г.
JANUARY – FEBRUARY 2015**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

Ж. А. Арзықұлов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к е ң е с і:

Абжанов Архат (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

Ж. А. Арзыкулов

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахишев**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

Абжанов Архат (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz / biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2015

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov,
academician of NAS RK

Editorial board:

N.A. Aitkhozhina, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

Abzhanov Arkhat (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.
ISSN 2224-5308

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz> / biological-medical.kz

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2015

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 307 (2015), 99 – 109

**ANTI-OXIDATIVE STRESS *FeSOD* GENE CLONING
FOR SOYBEAN GENETIC TRANSFORMATION****O. I. Kershanskaya¹, M. A. Abdulzhanova¹, M. M. Ismailova¹,
S. K. Dauletbaeva¹, A. A. Gulevich²**¹Institute of Plant Biology and Biotechnology SC MES RK, Almaty, Kazakhstan,²Institute of Agricultural Biotechnology of RAAS, Moscow, Russian.

E-mail: gen_o.kersh@mail.ru

Key words: genetic engineering, *FeSOD* gene promoter construction, agrobacterial transformation, molecular identification.

Abstract. Soybean diseases are one of the serious problems that reduce their yield up to 15%, but studied quite enough in Kazakhstan. Globally, losses of soybeans from disease reach 11-50% of the total production. Plant resistance is an economic and sustainable means of controlling diseases. Attempts to enhance the natural protective systems, such as lignin biosynthesis by genetic engineering can help to limit the colonization of micro-pathogens.

Many biotic and abiotic stress factors have a negative impact on the various aspects of growth, development and productivity of plants. The plant is organism attached to the place of growing in the process of evolution has developed effective strategies for avoidance, tolerance and adaptation to different types of stress. The possibility of new 'omics' research, such as genomics, proteomics and metabolomics allowed researchers to determine the genetics of plants relationship to stress.

The transgenic approach allows us to go from the study of mechanisms of resistance to stress to improve plant resistance.

Genetic engineering of key metabolic pathways such as phenylpropanoid cycle is a powerful tool to crop biotechnology improving in the new stage of the Post-genomics era. Modern advances in plants genetic improvement included manipulation of one or more genes involved in the signaling/regulatory pathways or encoding enzymes involved in these pathways.

The objective of research is evaluation of genetic cloning technique to provide genetic constructing of a key antioxidant stress gene *FeSOD*, encoded enzyme of Fe- dependent superoxide dismutase confers resistance to oxidative stress and nonspecific resistance to various types of abiotic and biotic stresses, due to the launch of signaling pathways associated with reactive oxygen species (ROS). The creation of effective genetic construction of the target gene *FeSOD* were carried by molecular cloning of genes that are optimized during the research. The main results: the amino acid and nucleotide sequences and cloned signal sequences were investigated, expression cassettes, the map-T region of the target gene *FeSOD* were created. Gene was cloned into plant plasmid *pEXSOD10* and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strains *EHA105*. Cloning and identification of this gene were confirmed by PCR, restriction and sequencing analyses.

Thus, genetic construction of antioxidant stress gene *FeSOD* was created for plant transformation.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГЕНА АНТИ-ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *FeSOD* ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СОИ

О. И. Кершанская¹, М. А. Абдулжанова¹, М. М. Исмаилова¹,
С. К. Даулетбаева¹, А. А. Гулевич²

¹РГП Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²Научно-Исследовательский Институт Сельскохозяйственной Биотехнологии РАСХН, Москва, Россия

Ключевые слова: генетическая инженерия, промоторная конструкция гена *FeSOD*, агробактериальная трансформация, молекулярная идентификация.

Аннотация. Генетическая инженерия ключевых метаболических путей, таких как фенилпропаноидный цикл, является мощным средством улучшения сельскохозяйственных культур на новом этапе биотехнологии в пост-Геномную эру. На сегодняшний день успехи в генетическом улучшении растений к действию стрессов связаны с манипуляцией одного или нескольких генов, вовлеченных в сигнальные/регуляторные пути, или кодирующие ферменты, вовлеченные в эти пути. Целью данного исследования является разработка этапов генетического конструирования на примере создания промоторной конструкции ключевого гена антиокислительного стресса *FeSOD*, кодирующего фермент Fe-зависимая супероксид дисмутаза, который придает растениям устойчивость к окислительному стрессу и неспецифическую устойчивость к различным видам абиотических и биотических стрессов, за счет запуска сигнальных путей, связанных с активными формами кислорода (ROS). Создание эффективных генетических конструкций целевого гена *FeSOD* осуществляли методами молекулярного клонирования генов, оптимизированными в ходе исследовательской работы. Основные результаты: изучены аминокислотная и нуклеотидная последовательности; клонированы сигнальные последовательности, созданы кассеты экспрессии, карты Т-области целевого гена *FeSOD*. Ген клонирован в растительную плазмиду *pEXSOD10* и трансформирован в *Agrobacterium tumefaciens*, штамм *EHA105*. Подтверждено клонирование и идентификация данного гена методами ПЦР, рестрикции и секвенирования. Таким образом, создана генетическая конструкция гена *FeSOD* для трансформации растений.

Введение. Болезни сои в Казахстане являются одной из серьезных проблем, снижающих ее урожайность до 15%, но изучены совершенно недостаточно. Широко распространены болезни, вызванные микропатогенами и микрогрибами, такими как ложная мучнистая роса, возбудитель заболевания – микрогриб *Peronospora manshurica* (Naum.); бурая пятнистость листьев, возбудитель болезни – микрогриб *Phyllosticta sojaecola* Mass, *Phytophthora*, но меры борьбы с ними сводятся только к агротехническим мероприятиям. В мировом масштабе потери от болезней сои достигают 11-50% от валовой продукции. Устойчивость растений является экономическим и устойчивым средством управления болезнями. Попытки усилить природные защитные системы, такие как биосинтез лигнина методами генетической инженерии, могут помочь лимитировать колонизацию микро-патогенов [1, 2].

Многочисленные биотические и абиотические стрессовые факторы негативно влияют на различные аспекты роста, развития и продуктивности растений. Растение, как прикрепленный к месту произрастания организм, в процессе эволюции развил эффективные стратегии избегания, толерантности и адаптации к различным типам стрессовых ситуаций [3]. Возможности новых 'omics' исследований, таких как геномикс, протеомикс и метаболомикс позволили исследователям определять генетику отношения растения к стрессу [4].

Трансгенный подход позволяет перейти от изучения механизмов устойчивости к стрессу к улучшению устойчивости растения [5-14]. На сегодня успех генетического улучшения устойчивости растений к стрессам включает манипуляции единичных или нескольких генов, вовлеченных в сигнальные/регуляторные пути, или генов, кодирующих ферменты важнейших метаболических циклов. Для генетической трансформации сои и других сельскохозяйственных культур необходимо создание эффективных генетических конструкций генов, кодирующих процессы, связанные с неспецифической и специфической устойчивостью растений к биотическим стрессам и болезням.

Ген *FeSOD*, кодирует Fe-зависимую супероксид дисмутазу из *Arabidopsis thaliana*, которая локализуется в цитозоле. Данный фермент является первым в каскаде нейтрализации активных форм кислорода и осуществляет их превращение в пероксид – H_2O_2 . Пероксид, в свою очередь, далее нейтрализуется другими антиокислительными ферментами, такими как аскорбат пероксидаза, каталаза и др. Нейтрализация активных форм кислорода является важнейшим механизмом защиты от окислительного стресса, сопровождающего большинство абиотических и биотических воздействий.

Цель данного исследования: разработать этапы генетического конструирования на примере создания промоторной конструкции ключевого гена антиокислительного стресса *FeSOD*, кодирующего фермент Fe-зависимая супероксид дисмутаза, который придает растениям устойчивость к окислительному стрессу и неспецифическую устойчивость к различным видам абиотических и биотических стрессов за счет запуска сигнальных путей, связанных с подавлением активных форм кислорода (ROS).

Материалы и методы

Генетический материал: Конструкция гена анти-окислительного стресса *FeSOD* (Fe-зависимой супероксид дисмутаза – анти-ROS), экспрессионный вектор – растительная плаزمида *pEXSOD10*, *CAMV35S* промотор из вируса табачной мозаики, маркерный ген устойчивости к канамицину *NPTII*).

Методы: Создание эффективной генетической конструкции гена *FeSOD* осуществляли методами молекулярного клонирования генов [15]: выделение плазмидной ДНК; гель-электрофорез в 0,8% агарозном геле в ТАЕ буфере с добавлением этидиума бромида; выделение фрагментов ДНК из агарозного геля; подготовка компетентных клеток бактерий; бактериальная трансформация плазмидной ДНК с компетентными клетками; рестрикция плазмидной ДНК; лигирование фрагментов ДНК; идентификация и секвенс генов с применением BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Использованы методы клонирования и конструирования генетических конструкций целевых генов с последующей их идентификацией совместно с ВНИИСХБ, РАСХН, Россия; ИОГен им. Н. И. Вавилова РАН, Россия; ИЦБ КН МОН РК; University of Illinois, USA.

Нуклеотидную последовательность генов определяли в базе нуклеотидов с помощью web.site NCBI. Праймеры рассчитывали с использованием компьютерных программ «Vector NTI», «Applied Biosystems» и др.

Аминокислотная и нуклеотидная последовательности гена *FeSOD* использованы по материалам NCBI Reference Sequence: NM_001036633.1 [16].

Подготовка праймеров для ПЦР: С использованием компьютерных программ «Vector NTI», «Applied Biosystem» и др. рассчитывали и готовили праймеры к генам, входящим в конструкции маркерных и целевых генов.

Два специфических праймера были подобраны к последовательности гена *FeSOD* для амплификации фрагмента величиной 645 пар оснований.

Гель-электрофорез в агарозе: В работе использовали 0,8% агарозу, приготовленную на ТАЕ буфере с добавлением этидиума бромида до конечной концентрации (0,5 мкг/мл). Электрофорез проводили в буферной системе ТАЕ.

Молекулярно-биологическая детекция интеграции целевого гена: Использовали следующие условия проведения реакции амплификации с геном *FeSOD* на ПЦР амплификаторе «Mastercycler® personal», Eppendorf, Germany – температура отжига, репликации, продолжительность синтеза ДНК, 35 число циклов, условия хранения продукта ПЦР.

Программа ПЦР для гена *FeSOD*: 94 °C – 3 мин, 94 °C – 45 сек, 60 °C – 45 сек, 72 °C – 1 мин.30сек, 72 °C – 10 мин., сохранение продукта ПЦР при -10°C. Продукты ПЦР разделяли с помощью агарозного гель-электрофореза.

Рестрикция векторов для трансформации растений; выделение фрагментов ДНК, несущих последовательность целевого гена. Рестрикцию ДНК проводили тупощепами

ферментами HindIII, XbaI, BamHI, фирмы Fermentas. Рестрикцию проводили в объёме 20 мкл: 2 мкл 10X буфера для соответствующей рестриктазы, нужный объём раствора плазмидной ДНК (в зависимости от концентрации), рестриктазы (в зависимости от активности), доводили до 20 мкл деионизированной водой MilliQ, инкубировали 1 - 1,5 часа при 37 °С.

В случае двойной рестрикции, если оптимальные буферы для каждой из рестриктаз не совпадали, после прохождения первой рестрикции 5 мкл рестрикционной смеси использовали для электрофореза в качестве контроля полноты рестрикции, а оставшийся объём (15 мкл) пересаждали 1,5 мкл 5М ацетата натрия и 45 мкл 96%-ного этанола, выдерживали 20 минут при -20°С, затем центрифугировали 10 мин. на центрифуге при 13400 об./мин. Дважды промывали осадок 80 % этиловым спиртом в количестве 500 мкл (каждый раз центрифугировали по 5 мин при 13400 об./мин.), подсушивали, растворяли в необходимом объёме MilliQ H₂O, добавляли 2 мкл 10X буфера и нужный объём рестриктазы.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля: 1. Участок геля с нужным фрагментом вырезали стерильным скальпелем и переносили в пробирку Eppendorf. 2. Добавляли 2.5VКI (7M) (250 мкл на 100 мклагарозного фрагмента). Смесь инкубировали на водяной бане (600 °С) в течение 5 мин. 3. Добавляли 15 мкл раствора стеклянных бусинок (Glassmilk). Ресуспендировали на вортексе. Переносили на 5 мин. в лед. 4. Центрифугировали в течение 10 сек. при 13400 об./мин. Надосадочную жидкость сливали. Осадок 3 раза промывали раствором New-washing (по 100 мкл). 5. Добавляли 5-15 мкл H₂O и ресуспендировали. Переносили пробирку на водяную баню (600°С) на 2 мин. 6. Центрифугировали при 13400 об./мин. в течение 15 сек. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. Последние четыре процедуры повторяли. Очищенные фрагменты ДНК использовали для дальнейшей работы.

Растворы: 10% Glassmilk: 10 мг silica в 100 мкл деионизированной H₂O. New-washing: 100 мМ NaCl; 10 мМ TrisHCl (pH 7.2); 1 мМ EDTA; 50% этанол.

Определение нуклеотидной последовательности целевого гена. Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) ищелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas).

Реакцию секвенирования проводили с применением Big Dye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) в НЦБ КН МОН РК. Для генно-инженерных манипуляций препаративную наработку плазмиды проводили в клетках *E.coli*, в широко используемых штаммах JM109 или XL1 Blue.

Подготовка компетентных клеток бактерий: 1. Ночную культуру *E.coli* (штамм XL1 Blue) обновляли в новой LB среде (1:100). 2. К 10 мл среды добавляли 100 мкл ночной культуры и 10 мкл. Тс (тетрациклина) до конечной концентрации 12.5 мкг/мл. Выращивали при 37 °С в течение 1.5-2 час., контролируя концентрацию клеток при оптической плотности OD 600. 3. Охлаждали на льду в течение 10 мин. Культуру стерильно разливали в стерильные пробирки Эппендорфа. 4. Центрифугировали в течение 30 сек. при 13400 об./мин. Надосадочную жидкость тщательно убрали (стерильно). 5. Добавляли 350 мкл CaCl₂ (стоковый раствор 0.1 М). Ресуспендировали. Переносили на лед и инкубировали в течение 40 мин. 6. Центрифугировали в течение 30 сек. при 13400 об./мин. Надосадочную жидкость тщательно убрали (стерильно). 7. Добавляли 200 мкл CaCl₂ (стоковый раствор 0.1 М) и аккуратно встряхивали. Полученные компетентные клетки использовали для бактериальной трансформации.

Проводили трансформацию агробактериального штамма полученной генно-инженерной конструкцией с добавлением конкретного антибиотика для каждой конструкции (спектиномицина для *FeSOD*, канамицина для других генов в концентрации от 70 до 100 мг/мл).

Трансформация *E. coli* плазмидной ДНК: 1. К компетентным клеткам добавляли плазмидную ДНК (1 мкг на 200 мкл клеток) или лигазную смесь (10 мкг на 200 мкл клеток). Переносили на 30 мин. в лед. 2. Проводили тепловой шок в течение 2 мин. при 42°С. Переносили клетки на 5 мин. в лед. 3. Добавляли в пробирки по 1мл LB среды (без антибиотика). Инкубировали при 37°С в течение 1 час. 4. Центрифугировали 45 сек. при 13400 об./мин. Надосадочную жидкость сливали и ресуспендировали в оставшейся среде. 5. Клетки высаживали в агаризованную LB среду, содержащую соответствующий антибиотик как селективный агент.

Растворы, используемые для этого метода: жидкая LB среда (на 1 л): бактотриптон 10 г; дрожжевой экстракт 5 г; NaCl 5 г; агаризованная LB среда (на 1 л): жидкая LB среда + бактоагар 15 г; ампициллин (до 2 мкл/мл)

Лигирование проводили в объеме 20 мкл: 2 мкл 10X буфера для T₄-ДНК-лигазы. Необходимые объемы вектора и вставки, гидролизованных рестриктазами 0,7 мкл T₄-ДНК-лигазы. Объем доводили MilliQ H₂O. Оптимальная температура лигирования 14 - 18°C, поэтому процесс проводили на водяной бане в течение 1,5 часов.

Результаты и их обсуждение

Известно, что при большинстве стрессов одним из наиболее значимых компартментов растительной клетки для сохранения ее нормальной жизнедеятельности является хлоропласт. По этой причине в генно-инженерной конструкции ген *FeSOD* снабжен сигнальной последовательностью, направляющей его белковый продукт в пластиду. По полученным ранее данным этот ген придавал растениям устойчивость к некоторым видам стресса: UV-облучение, засоление (NaCl, Na₂SO₄). Предполагается, что конструкция с данным геном сможет придавать устойчивость к холодovому и осмотическому стрессу, затоплению и к некоторым видам биотических стрессов [17-19].

Сигнальная последовательность, направляющая продукт в хлоропласт. Данная сигнальная последовательность взята из гена малой субъединицы рибулозобисфосфат карбоксилазы-оксигеназы (*Rubisco*) гороха.

MASMISSAVTTVSRASTVQSAAVAPFGGLKSMTGFPVKKVNTDITSITSNGGRVKC
atgctctatgatctctcagctgtgactacagtcagccgtctctacggcgcaatcgcccgctccattcgccgctcaatccat
gactggattcccagttaagaaggtcaacactgacattactccattacaagcaatgggtggaagagtaaagtgc

Место стыка между сигнальной последовательностью и зрелым белком FeSOD

VKCM ↓ DL ↓ NYVL

GTAAAGTGCATGGATCTAAACTACGTCCTC

Стрелками обозначены конец сигнальной последовательности и начало зрелого белка *FeSOD*, между ними – введенные две лишние аминокислоты для обеспечения стыковки между сигналом и собственно белком ("взаимоуничтожившиеся" сайты рестриктаз BamHI и BglIII).

Таким образом, расшифрованные аминокислотные и нуклеотидные последовательности данного гена анти-окислительного стресса *FeSOD*, кодирующего Fe-зависимую супероксид дисутазу, позволили создать полную карту гена и использовать их для создания генетической конструкции.

Составление карты кассеты экспрессии. Как известно, экспрессионная кассета – фрагмент ДНК, в который может быть вставлена чужеродная ДНК в целях обеспечения ее экспрессии в клетке. Экспрессионная кассета, как правило, является частью экспрессионного вектора и содержит все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена. Одним из ключевых генетических элементов кассеты экспрессии является промотор – участок ДНК, обеспечивающий эффективное связывание РНК-полимеразы и высокую скорость синтеза матричной РНК. Для трансформации в работе был выбран мощный конституционный промотор из вируса табачной мозаики – CAMV35S. Промотор CAMV35S обеспечивает транскрипцию в любых геномах растений. Промотор CAMV35S является конститутивным, что обеспечивает постоянную, сильную экспрессию гена, который находится под его регуляцией, во всех тканях трансгенного растения. В ряде случаев при трансформации растительной клетки в геноме все равно заменяют его собственный промотор на промотор CAMV35S как более сильный, чтобы повысить выход белкового продукта [20].

Уникальные сайты рестрикции – *EcoRV* (рестриктаза II типа) и *HindIII* (сайт-специфическая ДНК рестриктаза II типа).

Таким образом, карта кассеты экспрессии содержит CAMV35S промотор из вируса табачной мозаики для трансформации целевого гена в двудольные растения, последовательность целевого гена *FeSOD*, полиА стоп кодон, уникальные сайты рестрикции (рисунок 1).

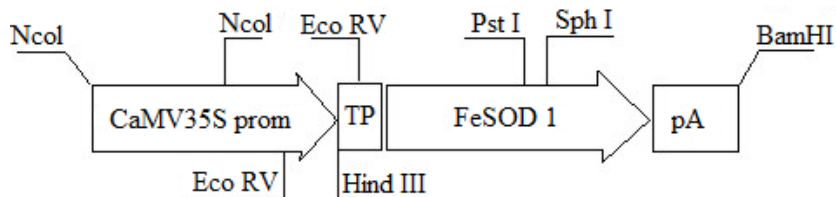


Рисунок 1 – Карта кассеты экспрессии гена *FeSOD*

Вставка кассеты экспрессии с целевым геном *FeSOD* в Т-область. Созданная карта кассеты экспрессии гена *FeSOD* далее была вставлена в карту Т-области плазмидного вектора *pEXSOD10*.

Карта Т-области гена *FeSOD* от левого борта к правому содержит: сигнальную последовательность, направляющую продукт в хлоропласт OCS, маркерный ген устойчивости к канамицину *NPTII*, *NOS*-промотор для этого гена, промотор из вируса табачной мозаики для интродукции целевого гена в двудольные растения сои, последовательность целевого гена *FeSOD*, полиА сигнал – стоп кодон, т.е. представляет линейную конструкцию с минимальным набором необходимых генетических элементов для интродукции гена в растение (рисунок 2).

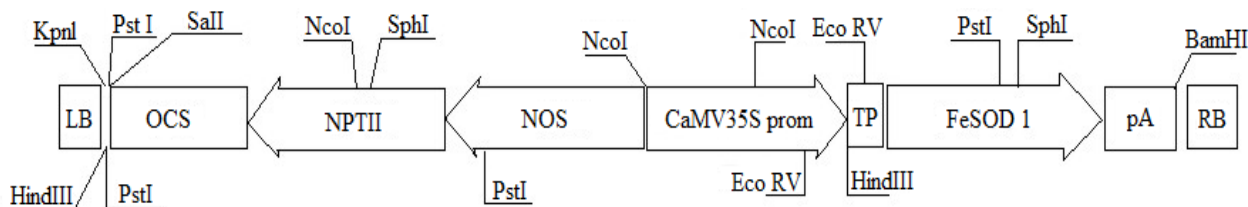


Рисунок 2 – Карта Т-области гена *FeSOD*

Создание карты экспрессионного вектора, содержащего Т-область. Общеизвестно, что термин «экспрессионный вектор» означает плазмидную ДНК, содержащую все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в нее целевого гена, промотор и терминатор, и элементы для амплификации экспрессионной кассеты и отбора клонов с множественными копиями экспрессионной кассеты в геноме.

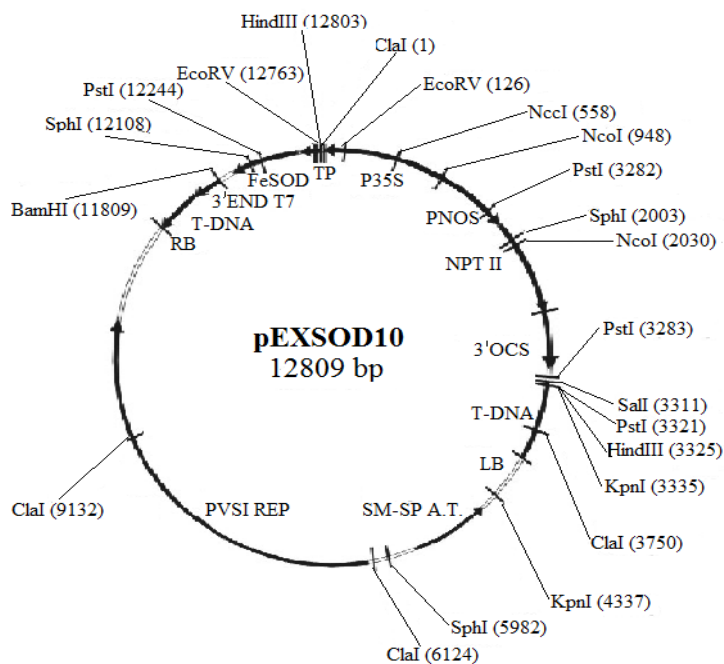


Рисунок 3 – Карта экспрессионного вектора, содержащего Т-область гена *FeSOD*

Полученная кассета экспрессии была клонирована в экспрессионный вектор *pEXSOD10*. Таким образом, экспрессионный вектор – растительная плазида *pEXSOD10* размером 12809 п.о., содержит Т-область гена *FeSOD* и необходимые сайты рестрикции (рисунок 3).

Созданный экспрессионный вектор использовали для дальнейших генетических манипуляций.

Подбор праймеров к последовательности целевого гена и ПЦР. Праймер – это короткая последовательность, которая соединяется с одной цепью ДНК и обеспечивает свободный 3'ОН конец, с которого ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

Поэтому на данном этапе был осуществлен поиск праймеров к последовательности гена антиокислительного стресса *FeSOD*.

В ходе исследования, два специфических праймера, были подобраны к последовательности гена *FeSOD* для амплификации фрагмента величиной 645 пар оснований:

Прямой праймер *FeSOD* 5'-ACCTCCATTCGCACTGGATGCTTT-3',

обратный праймер *FeSOD* 5'-TTCGGTGATGCAGAACTCACTGT-3'.

Проведен ПЦР с фрагментом целевого гена *FeSOD* (рисунки 4 и 5).

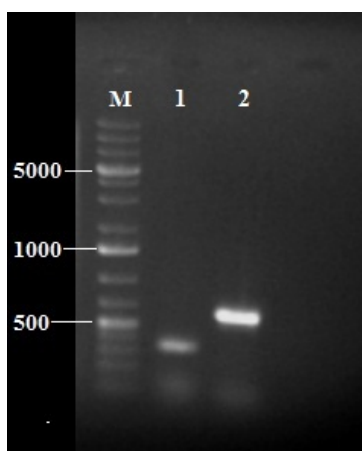


Рисунок 4 – Гель-электрофорез с продуктами ПЦР генов *Ac** и *FeSOD*. Слева направо: М – маркер; 1 – ген *Ac*; 2 – ген *FeSOD* (*Примечание: клонирование гена *Ac*, кодирующего хитин-связывающий белок из *Amarantus caudatus* в данной статье не рассматривается.)

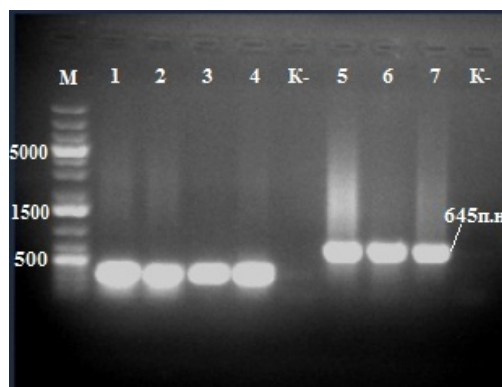


Рисунок 5 – Электрофореграммы ПЦР амплификации фрагментов целевых генов *Ac* и *FeSOD* размером 350 и 645 п.о. соответственно. Слева направо: М – маркер; 1-4 – продукты ПЦР фрагмента целевого гена *Ac*; К – контроль; 5-7 – электрофореграммы продуктов ПЦР фрагмента целевого гена *FeSOD*, соответствующего 645 п.о.)

Рекомендуемая амплификационная смесь содержала 100 нг ДНК, 3мМ $MgCl_2$, 250 μ MdNTPs, 0,25 μ M каждого праймера, 1 х PCR буфер и 1 ед. Таq-полимеразы (СибЭнзим) в реакционном объеме 20 мкл. ПЦР проводили при следующем режиме: 94°C – 3 мин., далее 40 циклов 94 °C – 45 сек., 60 °C – 45 сек., 72 °C – 1 мин. 30 сек., и конечная элонгация при 72 °C – 10 мин.

Продукты ПЦР разделяли с помощью агарозного гель-электрофореза. Показано наличие бендов, соответствующих 645 п.о.– величине фрагмента гена *FeSOD*.

Трансформация полученной генно-инженерной конструкции *Agrobacterium tumefaciens*.

Следующим этапом генетических манипуляций является введение рекомбинантной ДНК в клетку хозяина, то есть трансформация. Для увеличения проницаемости клеточных мембран на них воздействуют электрическим током – электропорация. Условия ее проведения были стандартными. Клеточную суспензию (50 мкл) и ДНК помещали в сосуд с погруженными в него электродами и подавали единичный импульс тока длительностью 4,5 мс (емкость конденсатора 25 мкФ), напряжение 2,5 кВ, сопротивление 200 Ом.

Полученный бинарный экспрессионный вектор *pEXSOD10* был внедрен с помощью процедуры электропорации в компетентные клетки штамма ЕНА 105 *Agrobacterium tumefaciens*. Клетки агробактерии были высеяны на агаризованную стандартную среду LB, на которой обычно выращивают бактериальные клетки *E. coli*, с добавлением антибиотика спектиномицина в концентрации от 70 до 100 мг/мл (рисунок 6).



Рисунок 6 – Экспрессионный вектор *pEXSOD10*, несущий Т-область гена *FeSOD*, трансформированный в *Agrobacterium tumefaciens*

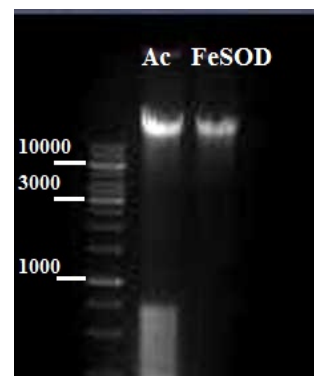


Рисунок 7 – Электрофореграмма плазмидной ДНК фрагментов генов *Ac* и *FeSOD* размером около 13 500 п.о.

Колонии появлялись на вторые сутки культивирования при 28°C. Об эффективности трансформации судили по результатам молекулярной детекции.

Подтверждение наличия агробактериальной трансформации конструкции посредством выделения плазмидной ДНК из клеток *Agrobacterium tumefaciens*. Для подтверждения наличия введенного экспрессионного вектора внутри агробактериальных клеток была выполнена процедура выделения плазмидной ДНК из клеток *Agrobacterium tumefaciens*. Бактериальную суспензию наращивали в жидкой среде LB в 300 мл колбах с интенсивным качанием. Антибиотик спектиномицин добавляли в концентрации приблизительно 70-100 мг/мл. Методика выделения стандартная – щелочной лизис [15], подробно описанный в разделе «Методы исследований». Для генно-инженерных манипуляций препаративную наработку плазмиды проводили в клетках *E. coli*, в штамме JM109.

Для агробактериального штамма – использовали антибиотик – спектиномицин, для отбора трансформированных растений на следующих этапах исследования будет использован антибиотик – канамицин.

Для подтверждения включения фрагмента целевого гена *FeSOD* в плазмиду *pEXSOD10* выделена плазмидная ДНК и проведен ее электрофорез по описанному выше методу (рисунок 7).

Показано наличие четких бендов, соответствующих размерам плазмиды плюс фрагмент гена *FeSOD* (12809 + 645 = 13 454 п.о.), в сумме составляющих около 13 500 п.о.

Идентификация и секвенирование гена *FeSOD*. Анализ нуклеотидных последовательностей данного гена. Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas). Реакцию секвенирования проводили с применением Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности и результаты идентификации представлены в таблице.

Определение нуклеотидной последовательности гена *FeSOD* было осуществлено методом прямого секвенирования фрагментов с прямого и обратного праймеров.

Нуклеотидные последовательности этих генов были проанализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров; фрагменты, имеющие низкий показатель качества) что позволило получить нуклеотидные последовательности протяженностью 502 и 483 п.о. с прямым и обратным праймером для гена *FeSOD*.

Результаты секвенирования методом анализа нуклеотидной последовательности гена *FeSOD*

| Наименование образца | Праймер | Полученные нуклеотидные последовательности |
|----------------------|----------------------|--|
| Ген <i>FeSOD</i> | Прямой 502 п.о. | ACTCTGGAGTTTCACTGGGGAAACATCACAGAAGCTTACGTGGACAACCTCAA GAAACAGGTTCTTGGAAACCGAGCTTGAAGGCAAGCCCTTAGAGCACATTATCC ACAGCACTTACAACAATGGTGATCTCCTCCCTGCTTCAACAACGCTGCTCAGG CGTGGAACCACGAGTTCTTCTGGGAGTCAATGAAACCAGGTGGTGGAGGAAA ACCATCAGGAGAGCTTCTGCTTTGCTTGAAGAGATTTCACTTCTTATGAGAA GTTCTATGAAGAGTTCAATGCTGCTGCAGCCACTCAGTTTGGAGCTGGCTGGG CCTGGCTTGCTTATTCAAATGAAAACTCAAAGTAGTGAAAACTCCCAATGCT GTGAATCCCCTTGCTCGGCTCTTCCCATTGCTTACCATTGATGTCTGGGAG CATGCTTACTACCTTGACTTCCAGAACCGAAGACCAGATTACATAAAGACATT CATGACCAATCTTGTGTCTTGGG |
| | Обратный 483 п.о. | GCTTGAAGGCAAGCCCTTAGAGCACATTATCCACAGCACTTACAACAATGGTG ATCTCCTCCCTGCTTCAACAACGCTGCTCAGGCGTGGAACCACGAGTTCTTCT GGGAGTCAATGAAACCAGGTGGTGGAGGAAAACCATCAGGAGAGCTTCTTGC TTTGCTTGAAGAGATTTCACTTCTTATGAGAAGTTCTATGAAGAGTTCAATGC TGCTGCAGCCACTCAGTTTGGAGCTGGCTGGGCCTGGCTTATTCAAATGA AAAACTCAAAGTAGTGAAAACTCCCAATGCTGTGAATCCCCTTGCTCGGCT CTTCCCATTGCTTACCATTGATGTCTGGGAGCATGCTTACTACCTTGACTTCC AGAACCGAAGACCAGATTACATAAAGACATTCATGACCAATCTTGTGTCTTGA GAAGCTGTAAGTGCCAGACTTGAAGGCCGCCAAAGGCTGCTTCTGCTGAAAGC AAG |

Секвенированные нуклеотидные последовательности были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Показано, что секвенированная с прямым праймером нуклеотидная последовательность размером 502 п.о. идентична фрагменту кДНК копии гена *FeSOD*, с 171 по 673 п.о. Секвенированная с обратным праймером нуклеотидная последовательность размером 483 п.о. идентична фрагменту кДНК копии гена *FeSOD* с 246 по 924 п.о., использованному нами для создания генетической конструкции.

Целевой ген в созданных генетических конструкциях идентифицирован с исходными нуклеотидными последовательностями NCBI.

Таким образом, поставленная цель исследования – создание генетической конструкции гена, кодирующего фермент Fe – зависимая супероксид дисмутаза, придающим устойчивость к окислительному стрессу и неспецифическую устойчивость к различным видам абиотических и биотических стрессов, была достигнута. Поэтапно описаны стадии конструирования целевого гена. Предложенная генетическая конструкция гена анти-окислительного стресса *FeSOD* (Fe-зависимой супероксид дисмутаза) может быть использована как модель клонирования генов при создании трансгенных растений.

ВЫВОДЫ. Представлена информация о ключевом гене анти-окислительного стресса *FeSOD* (Fe-зависимой супероксид дисмутаза), его функции.

Исследована последовательность генов: нуклеотидная последовательность кДНК копии генов; аминокислотная последовательность белков, кодируемых данным геном; клонированы сигнальная последовательность, направляющая продукт в хлоропласт.

Созданы кассеты экспрессии данного целевого гена.

Сконструирована карта Т-области.

Представлена карта экспрессионного вектора, содержащего Т-область.

Для подтверждения экспрессии гена проведены подбор праймеров к последовательности целевого гена, ПЦР-анализ, рестрикции по специфическим сайтам.

Проведена трансформация агробактериальных штаммов полученными генно-инженерными конструкциями.

Подтверждено клонирование генетических конструкций посредством выделения плазмидной ДНК из клеток *Agrobacterium tumefaciens*, ПЦР, рестрикции и электрофореза в агарозном геле.

Проведены идентификация и секвенирование гена анти-окислительного стресса *FeSOD*.

Выражение благодарности. Выражаем глубокую благодарность сотрудникам: ВНИИСХБ, РАСХН, Россия; Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Россия; НЦБ КН МОН РК;

University of Illinois at Urbana - Champaign, USA, за содействие в создании генетической конструкции и идентификации гена *FeSOD*.

Финансирование. НИР профинансирована по проекту «Улучшение устойчивости сои к биотическим стрессам путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла» выполненному в рамках подпрограммы 101 «Грантовое финансирование научных исследований». Приоритет «Интеллектуальный потенциал страны» 2013–2015 гг.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Lygin A.V., Abdel-Rahman M.M., Ulanov A.V., Widholm J.M., Lozovaya V.V. Polyethylene glycol treatment promotes metabolic events associated with maize callus morphogenic competence // *Phytochemistry*. – 2012. – Vol. 82. – P. 46-55.
- [2] Zernova O., Lygin A., Hill C., Widholm J., Lozovaya V. Genetic Engineering of Soybean Plant Innate Resistance // *Soy Poster Abstracts*. – USA, 2012. – P. 127.
- [3] Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F.L. Biotechnological approaches to study plant responses to stress // *Bio Med Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – 10 p.
- [4] Cabane M., Afif D., Hawkins S. Regulation of plant response to abiotic stresses // *Advances in Botanical Research*. – 2012. – Vol. 61. – P. 219-262.
- [5] Shou H., Palmer R.G. and Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol. 20. – P. 325-334.
- [6] Paz, M.M.; Martinez, J.C.; Kalvig, A.B.; Fonger, T.M.; Wang, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation // *Plant Cell Reports*. – 2005. – Vol. 25. – P. 206-213.
- [7] Li. Z., Nelson R., J. Widholm J., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. – Univ. of Illinois, Urbana, 2009. – Web site.
- [8] Li Z., Nelson R.L., Widholm J.M., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway // *Soybean Genet Newslett.* – 2002. – Vol. 29. – P. 1-11.
- [9] Пат. 20088867598 США. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free sm GFP cassette into soybean via ovary-drip transformation / Liu J., Su Q., An L. and Yang A. 2009.
- [10] Пат. 20090077694 США. Soybean transformation method / Martinell B.J., Julson L.S., Emler C.A., Huang Y., McCabe D.E., Williams E.J. 19.03.2009.
- [11] Yin X., Zhang Z.J. Recent patents on plant transgenic technology // *RIKEN Plant Science Center*. – 2010. - P. 1-22.
- [12] Hui L., Tian-long W. Transforming agrobacterium into soybean by means of pollen tube pathway induced by CaCl₂ // *Jiaotong University, Shanghai*. – 2011. - Vol. 01. – P. 1.
- [13] Kershanskaya O.I. Germ-line Plant Transformation Technologies in Wheat and Soybean // *Plant transformation technologies II*. – Intern. Conference, Vienna, Austria. – 2011. P. 17-18.
- [14] McWilliams D.A., Berglund D.R., Endres G.J. Soybean Growth and Management Quick Guide // *NDSU Institutional Repository*. – 2004. - Vol. 8. – P. A1174.
- [15] Маниатис Т., Фрэнч Э., Сэмбук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 282 с.
- [16] Mayer K. et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana* // *Nature*. – 1999. – Vol. 402(6763). – P. 769-777.
- [17] Myouga et al. A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20. – P. 3148-3162.
- [18] Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Enzymes in Leaves of Transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* Plants, with *FeSOD1* Gene // *Russian Agricultural Sciences*. – 2010. - Vol. 36, N 4. – P. 242-249.
- [19] Van Camp W. et al. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli* // *PNAS*. – 1990. – Vol. 87. – P. 9903-9907.
- [20] Odell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter // *Nature*. – 1985. – Vol. 313. – P. 810-812.

REFERENCES

- [1] Lygin A.V., Abdel-Rahman M.M., Ulanov A.V., Widholm J.M., Lozovaya V.V. Polyethylene glycol treatment promotes metabolic events associated with maize callus morphogenic competence. *Phytochemistry*, **2012**, *82*, 46-55.
- [2] Zernova O., Lygin A., Hill C., Widholm J., Lozovaya V. Genetic Engineering of Soybean Plant Innate Resistance. *Soy Poster Abstracts*, USA, **2012**, 127.
- [3] Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F.L. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *Bio Med Research International*, **2013**, *2013*, 10
- [4] Cabane M., Afif D., Hawkins S. Regulation of plant response to abiotic stresses. *Advances in Botanical Research*, **2012**, *61*, 219-262.
- [5] Shou H., Palmer R.G. and Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2011**, *20*, 325-334.

- [6] Paz, M.M.; Martinez, J.C.; Kalvig, A.B.; Fonger, T.M.; Wang, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Reports*, **2005**, *25*, 206-213.
- [7] Li, Z., Nelson R., J. Widholm J., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. Univ. of Illinois. Urbana. et al., **2009**. Web site.
- [8] Li Z., Nelson R.L., Widholm J.M., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. *Soybean Genet Newsletter*, **2002**, *29*, 1-11.
- [9] Liu J., Su Q., An L., Yang A. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free sm GFP cassette into soybean via ovary-drip transformation. *Patent USA no 20088867598*, **2009**.
- [10] Martinell B.J., Julson L.S., Emler C.A., Huang Y., McCabe D.E., Williams E.J. Soybean transformation method. *Patent USA no 0090077694*, **19.03.2009**.
- [11] Yin X., Zhang Z.J. Recent patents on plant transgenic technology. *RIKEN Plant Science Center*, **2010**, 1-22.
- [12] Hui L., Tian-long W. Transforming agrobacterium into soybean by means of pollen tube pathway induced by CaCl₂. *Jiaotong University, Shanghai*, **2011**, *01*, 1.
- [13] Kershanskaya O.I. Germ-line Plant Transformation Technologies in Wheat and Soybean. *Plant transformation technologies II*. Intern. Conference, Vienna, Austria. **2011**, 17-18.
- [14] McWilliams D.A., Berglund D.R., Endres G.J. Soybean Growth and Management Quick Guide. *NDSU Institutional Repository*, **2004**, *8*, A1174.
- [15] Maniatis T., Frecch E., Sembuk D. Molecular cloning. Moscow, **1984**, 282.
- [16] Mayer K. et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **1999**, *402*(6763), 769-777.
- [17] Myouga et al. A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **2008**, *20*, 3148-3162.
- [18] Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Enzymes in Leaves of Transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* Plants, with *FeSOD1* Gene. *Russian Agricultural Sciences*, **2010**, *36*, № 4, 242-249.
- [19] Van Camp W. et al. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *PNAS*, **1990**, *87*, 9903-9907.
- [20] Odell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. *Nature*, **1985**, *313*, 810-812.

МАЙБҰРШАҚТЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТРАНСФОРМАЦИЯСЫНА АРНАЛҒАН АНТИ-ОКСИДАНТТЫҚ *FeSOD* ГЕНДІ ҚҰРАСТЫРУ

О. И. Кершанская¹, М. А. Абдулжанова¹, М. М. Исмаилова¹, С. К. Даулетбаева¹, А. А. Гулевич²

¹РМК Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы Институты ҒК БҒМ ҚР, Алматы, Қазақстан,

²АШРФА Ауылшаруашылық биотехнология ғылыми-зерттеу институты, Мәскеу, Ресей

Тірек сөздер: генетикалық инженерия, *FeSOD* генінің 35 S промоторлы конструкциясы, агробактериалды трансформация, молекулалық идентификация, қышқылдану стресі, май бұршақ.

Аннотация. Биотехнологияның геномнан кейінгі жаңа ғасырындағы фенилпропаноидты цикл сияқты негізгі метаболитті жолдардың генетикалық инженериясы, ауыл шаруашылығы дақылдарын жақсартудың әсерлі әдісі болып табылады. Бүгінгі күні өсімдіктерді стресстерге қарсы генетикалық жақсарту, бағдар беретін бір немесе бірнеше гендердің немесе осы мақсатқа пайдаланылатын кодтайтын ферменттердің әсеріне байланысты. Орындалып отырған ғылыми ізденістің мақсаты, (ROS) белсенді оттегі формаларының бағдарлы жолдарын іске қосу арқылы, өсімдіктердің қышқылдық және биотикалық стресстерге төзімділігін арттыратын, Fe-бағынышты супероксид дисмутаза ферментін кодтайтын негізгі *FeSOD* генінің генетикалық конструкцияларын құрастыру болып табылды. *FeSOD* мақсатты генінің тиімді генетикалық конструкциясын құрастыру, зерттеу барысында жақсартылған гендерді молекулалық клондау әдісімен жүргізілді. Негізгі нәтижелер: аминқышқылды және нуклеотидті тізбек зерттелді; *FeSOD* мақсатты генінің Т-аймағының бағдарлы тізбегі кодталды, экспрессия кассетасы және картасы құрастырылды. Ген *pEXSOD10* өсімдік плазмидасына клондалды және *EHA105* штамды *Agrobacterium tumefaciens*-ке трансформацияланды. Аталған геннің клондануы және танылуы ПЦР, кесу және орнын анықтау әдістерімен расталды. Осылайша, өсімдіктер трансформациялауға арналған *FeSOD* генінің генетикалық конструкциясы жасалды.

Поступила 27.02.2015 г.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www:nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

biological-medical.kz

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 15.02.2015.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
9,2 п.л. Тираж 300. Заказ 1.