

- А. І. Герц, Н. М. Дробик та ін.] // *Biotechnologia Acta*. — 2013. — Vol. 6. — P. 77—85.
3. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. — К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
 4. *Сохранение и микроразмножение in vitro растений Антарктики* / [Н. А. Матвеева, В. Б. Белокурова, В. А. Рудас и др.] // *Біотехнологія*, — 2010. — Т. 3, № 3. — С. 33—41.
 5. *Gielwanowska I. Biologiczne przystosowania roślin kwiatowych do warunków klimatycznych Antarktyki morskiej / I. Gielwanowska // Kosmos. Problemy nauk biologicznych* — 2013. — Т. 62. — P. 381—391.

УДК 581.1

ДОСЛІДЖЕННЯ УСПАДКУВАННЯ ГЕНУ $\Delta 9$ -АЦИЛ-ЛІПІДНОЇ ДЕСАТУРАЗИ ЦІАНОБАКТЕРІЇ У РОСЛИН ТЮТЮНУ Т1-ПОКОЛІННЯ

Т. М. Кирпа-Несміян

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
E-mail: t-kirpa@ukr.net

В період сезонних змін клімату сільськогосподарські насадження піддаються впливу абіотичних стресів, зокрема температурних. Одним з факторів, що дозволяє збільшити адаптацію рослин до коливання температур є збільшення в'язкості мембранних ліпідів. Це досягається завдяки збільшенню частки ненасичених жирних кислот (ЖК) в їхньому складі [2]. Десатурази – це ферменти, що сприяють утворенню подвійних зв'язків у жирних кислотах та тим самим перетворюють їх з насичених в ненасичених. Разом зі збільшенням частки ненасичених жирних кислот в складі мембранних ліпідів знижується температура переходу із фази гелю в рідкокристалічну фазу. Існує три види десатураз: ацил-ліпідні

десатурази, ацил-АПБ-десатурази та ацил-КоА-десатурази. У рослинному організмі функціонує два типи десатураз: ацил-ліпідні (використовують в якості субстрату ЖК, що знаходяться у складі ліпідів) та ацил-АПБ (використовують в якості субстрату ЖК асоційовані з переносним білком). Десатурація ЖК відбувається в строгій послідовності: перший подвійний зв'язок утворюється тільки в положенні $\Delta 9$, другий в положенні $\Delta 12$ тільки в моноєвих ЖК 16:1 або 18:1; подальша десатурація відбувається з використанням дієнових ЖК, передусім 18:2.

Десатурація потребує наявності молекулярного кисню та проходить в аеробних умовах. Десатурази були знайдені практично у всіх організмах, за винятком деяких бактерій, наприклад *Escherichia coli*. Вважається, що активні десатурази зв'язують два атоми трьохвалентного заліза та формують активний комплекс з атомом кисню: Fe-O-Fe. Цей комплекс розриває неактивовані -C-H- зв'язки та цим самим сприяє утворенню подвійних зв'язків -C=C- в ланцюгах ЖК [4].

В роботі ми використовували ген *desC* $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Synechococcus vulcanus*. Даний ген був злитий в одній рамці зчитування з геном репортерного білку термостабільної ліхенази *licBM3* бактерії *Clostridium thermocellum*. Оскільки субстрат даного ферменту, олеїнова кислота, знаходиться у хлоропластах, до 5' кінця послідовності гену *desC::licBM3* було приєднано послідовність малої субоддиниці РУБІСКО *Arabidopsis thaliana* (*RTP*) рослини *Arabidopsis thaliana* (*ats1A*) для забезпечення таргетингу у хлоропласти. Здійснили генетичну трансформацію даним вектором *Agrobacterium*-опосередкованим методом рослин *Nicotiana tabacum*, та отримали регенеранти рослин, які несуть в собі та експресують ген *RTP:desC::licBM3*. В отриманих рослинах проаналізували спектр жирних кислот за допомогою методу газової хроматографії та мас-спектрометрії. Було виявлено збільшення частки ліноленової кислоти. Досліджували стійкість даних рослин до знижених температур та заморозків (умови холодного стресу 0°C 20 хв, потім -5°C 80 хв). Як контроль використовували рослини *Nicotiana tabacum* та рослини *Nicotiana tabacum*, що експресують ген *gfp:licBM3* [3].

Проте, збереження даних ознак у поколінні T1 залишалось не дослідженим. У даній роботі було проведено аналіз на виявлення успадкування гену *RTP:desC::licBM3* та збереження його експресії. Для цього досліджували три отриманні трансгенні лінії тютюну та з яких відбирали насіння трьох рослин однієї лінії. Пророщували насіння на середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням селективного агенту фосфінотрицину (PPT) за умов 16 год освітлення, температура 24 °C. Пророщували насіння три тижні. Схожість насіння складала 89-92%. Потім пересаджували рослини у ґрунт та вирощували в умовах *in vivo*, у теплиці за умов: освітлення 16 год, вологість 35-45%, температура 14-25 °C. Для подальших аналізів використовували рослини віку двох-трьох місяців.

Загалом методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) було проаналізовано 21 рослини. З них у геномі 18 рослин знаходився ген *desC::licBM3*, що залишався у злитому стані. У 3-х проаналізованих рослинах було доведено наявність лише гену термостабільної ліхенази (*licBM3*). Оскільки ген *desC* знаходиться в одній рамці зчитування з геном репортерного білку термостабільної ліхенази *licBM3* був здійснений якісний ліхеназний тест для того, щоб визначити експресію гену десатурази [4]. В даному дослідженні як біфункціональний репортер використовувався ген термостабільної ліхенази анаеробної бактерії *Clostridium thermocellum*. Ця ціанобактерія використовується у виробництві, завдяки своїй здатності розчиняти целюлозу з утворенням етилового спирту (C₂H₅OH). Проведені дослідження з *Clostridium thermocellum* показали, що один з її білків здатний розщеплювати полісахариди, в яких молекули глюкози зв'язані β-1,3 та β-1,4 зв'язками, які чергуються. Такі полісахариди дуже рідко зустрічаються у рослинах та більшості інших організмів. Але вони були виділені з лишайників (ліхенани), тому фермент отримав назву «ліхеназа». Подальший аналіз показав, що даний білок є досить невеликим – приблизно 35 кДа або 334 амінокислотних залишків, найкраще працює за умов 70 ° - 80°C. Продукт даної реакції є глюкоза, її кількість можна визначити простими біохімічними методами. Внаслідок видалення областей, які не впливають на

ферментативну активність і стабільність, можна додатково зменшити розміри молекул до 26 кДа. Ефективна експресія в клітинах рослин, грибів та бактерій показала, що модифікований фермент *Clostridium thermocellum* може використовуватись як репортер, який є досить стабільний, специфічний чутливий та зручний для злиття з іншими білками [1].

Активність ліхенази вимірювали використовуючи ліхенан ("Sigma", USA) в якості субстрата. Концентрацію відновлених цукрів визначали за калібрувальним графіком, побудованому по глюкозі. За одиницю активності брали кількість ферменту, що утворює 1 мкмоль відновлених цукрів (як еквівалент глюкози) за 1 хв (в перерахунку на 1 мг білку). Питому активність розраховували на кількість білку. У всіх рослин, що успадкували ген *desC::licBM3* підтвердилась експресія гену, а у рослин які несуть в собі лише частину злитого гену (*licBM3*) не спостерігалось експресії цього гену.

Література

1. *Голденкова И.В.* Репортерная система, основанная на термостабильности лихеназы *Clostridium thermocellum*, для изучения регуляции экспрессии генов в клетках про- и эукариотических организмов. //Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирузян Э.С. // Молекулярная биология. — 2002. — Т. 36, № 4. — С. 868—876.
2. Amiri R.M, Yur'eva N.O., Shimshilashvili K.R., et.al. (2010) Expression of acyl-lipid Delta12-desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato. J Integr Plant Biol 52:289-297. doi:JIPB890
3. Gerasymenko I.M., Sakhno L.O., Купра Т.М., et. al. (2015) Characterization of *Nicotiana tabacum* plants expressing hybrid genes of cyanobacterial $\Delta 9$ or $\Delta 12$ acyl-lipid desaturases and thermostable lichenase. Russian J. Plant Physiol. 62(3), 283-29.
4. Los DA, Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim Biophys Acta 1666:142-157. doi:S0005-2736(04)00203-2.
5. Piruzian E., Goldenkova I., Musiychuk K., et.al. A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* // Mol. Genet. Genom. 2002. V. 266. P. 778–786.