

УДК 604.6:635.21

Д. В. САВЧИН¹, Т. Н. ВЕРЕСОВА¹, О. А. МЕЖНИНА¹, А. С. ПАНЮШ¹, А. О. ВЯЧЕСЛАВОВА²,
И. В. ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА³

**ОПТИМИЗАЦИЯ КОДОНОВОГО СОСТАВА ГРИБНОГО ГЕНА *GOX* *PENICILLIUM*
FUNICULOSUM ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ В РАСТЕНИЯХ *SOLANUM*
*TUBEROSUM***

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: stminsk@gmail.com,

²Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва,

³Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

(Поступила в редакцию 16.09.2014)

Введение. Негативные факторы внешней среды и распространение фитопатогенов приводят к поражению растений картофеля, снижению количества и качества урожая и потерям при хранении [1, 2]. Поэтому создание форм растений с повышенным уровнем устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды – актуальная задача. Одним из подходов повышения защитных свойств растений является получение биоинженерных форм растений, экспрессирующих гены, продукты которых способны проявлять защитные функции. В качестве гена, продукт которого может придать такие свойства растениям, нами выбран ген *gox*, кодирующий глюкозооксидазу [3–6]. Глюкозооксидаза (β -D-глюкозо: O2-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4) катализирует реакцию окисления β -D-глюкозы до β -D-глюконо- δ -лактона и сопряженное восстановление молекулярного кислорода до пероксида водорода. Пероксид водорода служит сигнальной молекулой и потенциально способен активизировать защитные системы растений.

Ранее нами были получены трансгенные формы растений картофеля [7–9] с нативным геном *gox*, выделенным из высокоактивного грибного штамма 46.1 *Penicillium funiculosum* [10]. Однако следует отметить, что для успешной реализации гетерологичной генетической информации важным условием является соответствие частот использования кодонов в последовательности экспрессируемого гена и пулом тРНК гетерологичного организма [11, 12]. Большое количество редко встречающихся кодонов в ряде случаев может приводить к значительному снижению скорости трансляции и, как следствие, уменьшению содержания целевого белка. Поэтому для повышения уровня синтеза глюкозооксидазы в растениях картофеля необходимо модифицировать нуклеотидную последовательность грибного гена *gox* в соответствии с частотой использования кодонов в растениях.

Цель работы – получение биоинженерных форм растений картофеля с повышенным содержанием эндогенного пероксида водорода в растительной ткани. Для этого проведена оптимизация кодонного состава нативного гена *gox* *Penicillium funiculosum*, созданы трансгенные формы растений картофеля с полученной модифицированной последовательностью этого гена и проведена сравнительная оценка уровня синтеза целевого фермента у растений, экспрессирующих нативный и модифицированный гены *gox*.

Материалы и методы исследования. Анализ кодонного состава нативного гена *gox* и растений *Solanum tuberosum* проведен с использованием программы Graphical Codon Usage Analyser (<http://gcua.schoedl.de/>) и базы данных Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), которая содержит информацию о частоте встречаемости кодонов в разных организмах.

Синтез фрагментов модифицированной последовательности гена *gox* осуществлен в ЗАО «Евроген» (Москва). Сборку полной последовательности гена *gox* из синтезированных фрагментов и конструирование векторной конструкции с целевым геном для трансформации растений выполнили в лаборатории. Полученную векторную конструкцию использовали в экспериментах по агробактериальной трансформации листовых дисков растений картофеля белорусской селекции сорта Скарб по методике, описанной ранее [7].

Относительную концентрацию фермента глюкозооксидазы в растительной ткани картофеля с нативным и модифицированным геном *gox* проводили следующим образом. В раствор, содержащий 3,4 мМ KI, 80 мМ C₆H₁₂O₆, 0,83 мМ Na₂MoO₄, вносили белковые препараты с выровненной концентрацией тотального белка. После 20 мин инкубации при температуре 37 °С проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 560 нм в трехкратной повторности. В результате реакции происходит окрашивание раствора в желтый цвет. Интенсивность окрашивания характеризует количество глюкозооксидазы: чем сильнее окрашивается раствор, тем выше содержание целевого белка в образце. Относительную концентрацию пероксида водорода в растительной ткани определяли спектрофотометрическим методом, основанным на окислении ионов железа Fe⁺² пероксидом водорода до ионов железа Fe⁺³, которые образуют окрашенные соединения с ксиленовым оранжевым [13]. Для описанных экспериментов было отобрано по 6 независимых трансгенных линий с каждой векторной конструкцией – линии трансгенных растений картофеля с модифицированным геном *gox*, описанные в данной статье (pBI-GOXmod) и полученные ранее с использованием нативного гена *gox* (pBI-L-GOX и pBI-F-GOX) [7–9]. В качестве контроля использованы растения, трансформированные исходным вектором pBI121 и растения исходного сорта Скарб.

Результаты и их обсуждение. Для того чтобы выяснить насколько кодоновый состав целевого гена *gox* соответствует частоте использования кодонов растений, его нуклеотидная последовательность была проанализирована с использованием базы данных Codon Usage Database. Проведение такого анализа является важным, поскольку позволяет установить, какие кодоны нативного гена *gox* *P. funiculosum* нуждаются в модификации для его эффективной экспрессии в растениях картофеля.

Оптимизация кодонового состава гена gox. Результаты сравнительного анализа частот встречаемости кодонов в последовательности нативного гена *gox* и генома *S. tuberosum* (рис. 1, а) позволили выявить следующее: последовательность нативного гена *gox* содержит 27,4 % несвойственных для растений картофеля кодонов, для которых внутриклеточная концентрация изоакцепторных тРНК ниже 10 % (в 3,1 % случаев) и ниже 20 % (в 24,3 % случаев), что может являться лимитирующим фактором в последующем процессе трансляции. Наиболее редко встречаются кодоны TCG, GCG и ACG, кодирующие аминокислоты серин, аланин и треонин соответственно. В связи с тем что последовательность, кодирующая нативный ген *gox*, содержит значительное количество кодонов, нехарактерных для растений картофеля, для повышения эффективности экспрессии данного гена необходимо выполнить оптимизацию нуклеотидной последовательности с заменой нуклеотидов, но без изменения аминокислотной последовательности белка.

С использованием свойства вырожденности генетического кода и данных о частоте встречаемости кодонов у растений проведена модификация нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* (рис. 1, б). Проведенная модификация позволила оптимизировать нуклеотидную последовательность целевого гена для экспрессии в растениях картофеля. Следует при этом подчеркнуть, что модификация нуклеотидной последовательности гена не изменила аминокислотную последовательность его белкового продукта.

Получение модифицированной последовательности гена gox. На начальной стадии оптимизации гена *gox* его нуклеотидная последовательность была проанализирована на наличие внутренних уникальных сайтов рестрикции, которые позволяют разбить последовательность гена на фрагменты небольших размеров. Такой анализ позволил применить метод конструирования нуклеотидной последовательности, основанный на синтезе и последующем объединении синтетических фрагментов целевого гена с заменами соответствующих кодонов в нуклеотидной последовательности. В результате проведенного анализа последовательность гена *gox* была разбита

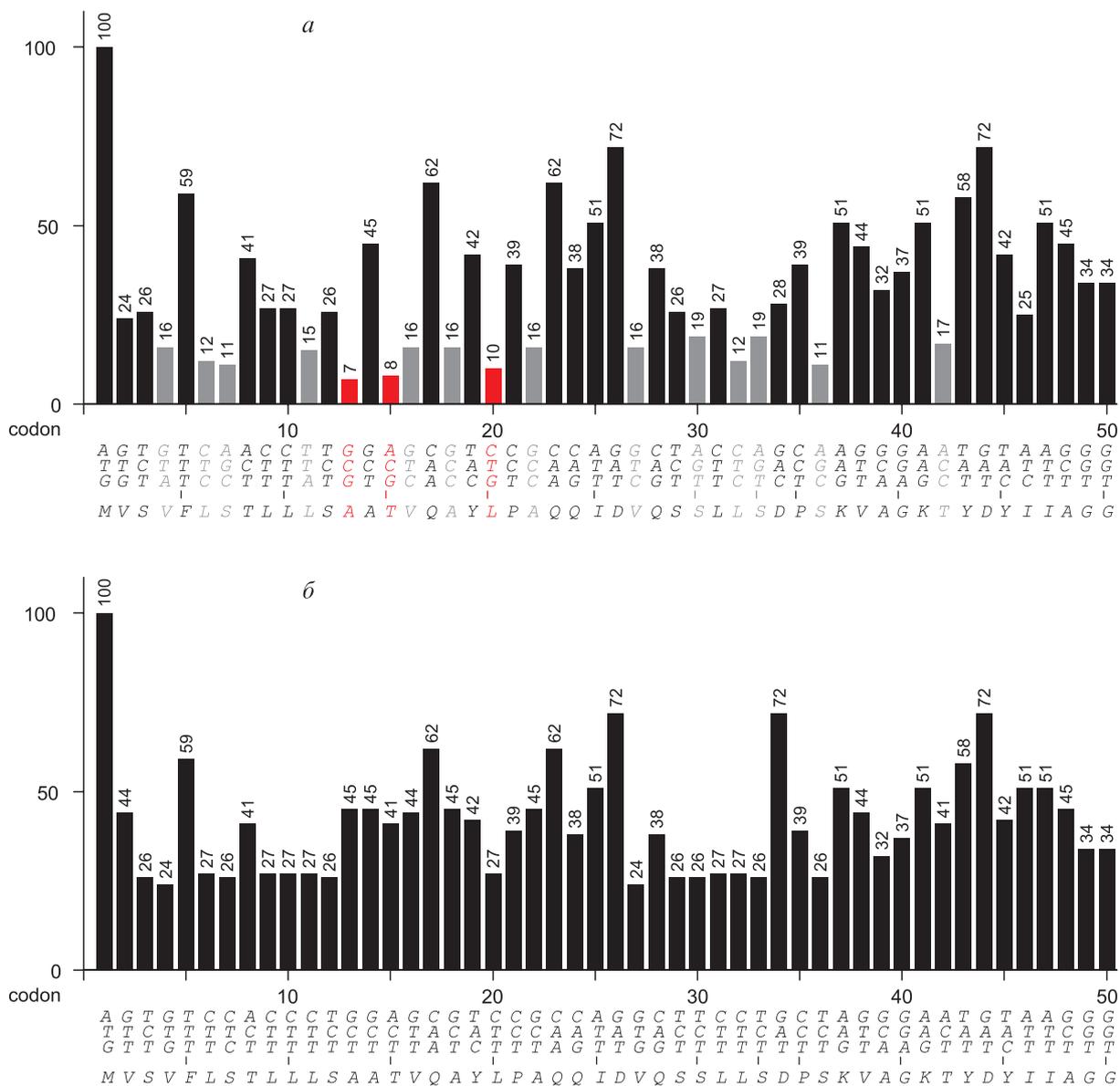


Рис. 1. Анализ частоты соответствия кодового состава нативного гена *gox* нуклеотидному составу растений *S. tuberosum* (a), анализ частоты соответствия кодового состава модифицированной последовательности гена *gox* нуклеотидному составу растений *S. tuberosum* (б)

на три фрагмента: 293 п.н., 820 п.н. и 753 п.н. В 5'- и 3'-концевые области фрагментов гена добавлены уникальные рестрикционные сайты *EcoRV*, *ApaI*, *EcoRI*, которые позволят клонировать последовательности в промежуточные бактериальные и растительные векторы.

Полученные фрагменты гена обозначены как *Gox_1*, *Gox_2*, *Gox_3* соответственно, а полно-размерный модифицированный ген как *gox-mod*. Сборку нуклеотидной последовательности модифицированного гена глюкозооксидазы проводили согласно схеме, представленной на рис. 2.

Первоначально, в вектор, несущий последовательность *Gox_1*, предварительно гидролизованный эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Xba*I, клонировали фрагмент *Gox_2*, который получали в результате гидролиза вектора с данным фрагментом ферментами *Bam*HI и *Xba*I. В результате клонирования получали промежуточный вектор, содержащий объединенные фрагменты *Gox_1* и *Gox_2*, который обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Eco*RI и клонировали в него фрагмент *Gox_3*, который получали в результате гидролиза вектора, несущего этот фрагмент ферментами *Xba*I и *Eco*RI. В результате клонирования получили вектор, в котором объединены три фрагмента модифицированного гена *gox*.

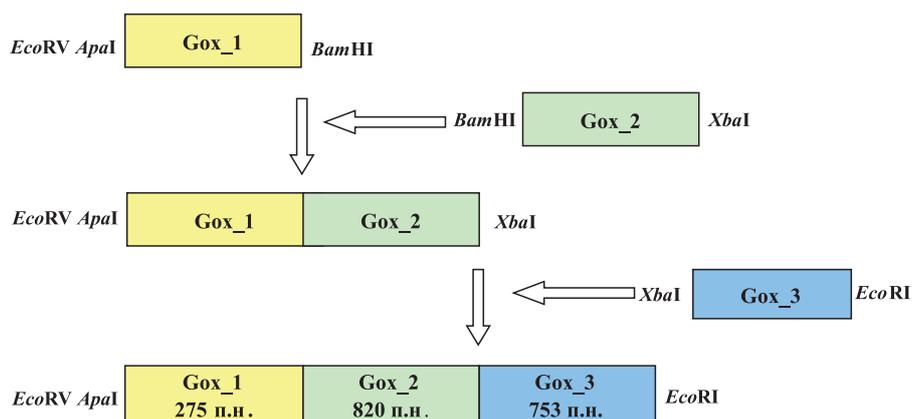


Рис. 2. Схема сборки нуклеотидной последовательности модифицированного гена *gox* из синтезированных фрагментов: Gox_1, Gox_2, Gox_3 – синтезированные нуклеотидные последовательности модифицированного гена *gox*; *EcoRV*, *ApaI*, *BamHI*, *XbaI*, *EcoRI* – сайты эндонуклеаз рестрикции

Корректность сборки нуклеотидной последовательности модифицированного гена глюкозооксидазы была подтверждена секвенированием. Результаты секвенирования показали отсутствие единичных нуклеотидных замен и, как следствие, подтвердили, что аминокислотная последовательность, кодируемая модифицированным геном *gox*, не отличается от таковой для нативного фермента. Собранная последовательность далее была использована для создания векторной конструкции для трансформации растений.

Создание векторной конструкции для экспрессии модифицированного гена глюкозооксидазы в растениях картофеля. Для создания векторной конструкции с модифицированным геном глюкозооксидазы использовали собранный ранее ген *gox-mod* и растительный вектор pBI121 [14]. В качестве регуляторного элемента использован конститутивный промотор 35S РНК CaMV с энхансером омега и лидерным пептидом гена экстенсина моркови. Данная последовательность клонирована с плазмиды pBI-F-GOX [7] методом ПЦР с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы и специфических праймеров. В результате получен экспрессионный вектор для трансформации растений, который несет ген устойчивости к канамицину под контролем Nos-промотора и модифицированный ген глюкозооксидазы, слитый с лидерным пептидом гена экстенсина моркови под контролем промотора 35S РНК CaMV и энхансера омега. Полученный вектор обозначен нами pBI-GOX-mod. Правильность сборки векторной конструкции проверяли с помощью ПЦР и рестрикционного анализа. С использованием данной векторной конструкции получен рекомбинантный агробактериальный штамм AGL0, который применяли для агробактериальной трансформации листовых эксплантов растений картофеля.

Создание и отбор трансгенных растений картофеля с модифицированной последовательностью гена gox. В результате проведения агробактериальной трансформации отобрано 37 регенерантов растений картофеля, трансформированных векторной конструкцией pBI-GOXmod, укоренившихся на среде с селективным агентом канамицином. Известно, что не все отобранные на селективной среде регенеранты могут нести в своем геноме или эффективно экспрессировать трансгенную вставку. В связи с этим необходимо проводить дополнительный отбор с помощью молекулярно-генетических и биохимических исследований. Как было описано ранее, наиболее эффективным методом отбора растений, экспрессирующих ген *gox*, является метод чашечного теста для определения глюкозооксидазной активности [7]. В результате проведенного отбора было выделено 20 линий растений, которые эффективно экспрессировали ген *gox*, что составило 54 % от общего количества растений, отобранных на селективной среде.

Сравнительный анализ экспрессии нативного и модифицированного гена gox в растениях картофеля. Для того чтобы экспериментально оценить насколько кодоновый состав гетерологичных генов влияет на эффективность их экспрессии в организмах-реципиентах, необходимо определить количество синтезируемого целевого белка или продуктов реакции, которую он катализирует. В данном случае нами было определено относительное содержание в растительной

ткани гетерологичного фермента глюкозооксидазы и пероксида водорода, который образуется в результате катализируемой им реакции (рис. 3).

Для эксперимента было отобрано по 6 независимых трансгенных линий, трансформированных векторными конструкциями pBI-L-GOX и pBI-F-GOX (несут нативный ген *gox*), pBI-GOXmod (несет модифицированный ген *gox*), в качестве контрольных растений использованы растения, трансформированные вектором pBI121 и исходного сорта Скарб.

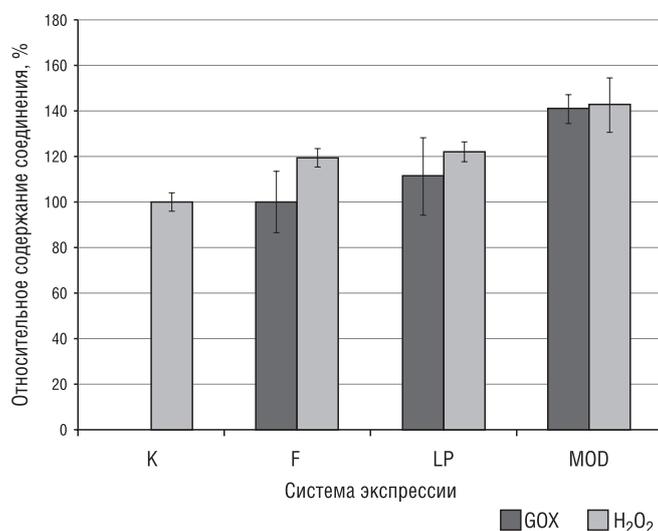


Рис. 3. Относительное содержание фермента глюкозооксидазы и пероксида водорода в растительной ткани: GOX – фермент глюкозооксидаза, H₂O₂ – пероксид водорода

Из представленных данных видно, что при экспрессии в растениях картофеля гена *gox* с оптимизированным кодоновым составом (рис. 3, MOD) отмечено достоверное увеличение уровня накопления целевого белкового продукта в растительных клетках по сравнению с накоплением белкового продукта нативного гена *gox* с неоптимизированным для экспрессии в растениях кодоновым составом (рис. 3, F и LP). При этом увеличение уровня гетерологичной глюкозооксидазы у трансгенных растений, экспрессирующих оптимизированный по кодоновому составу ген *gox* для эффективной экспрессии в растениях, приводит к достоверному увеличению уровня пероксида водорода в растительной ткани (рис. 3, MOD).

Заключение. Проведенный сравнительный анализ частот встречаемости кодонов в организмах *P. funiculosum* и *S. tuberosum* позволил выявить в последовательности нативного гена *gox* нехарактерные для растений картофеля кодоны, которые могут снижать скорость трансляции целевого белка и приводить к уменьшению его содержания в растительных клетках. С целью увеличения уровня накопления белка глюкозооксидазы в растениях картофеля проведена оптимизация нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* *P. funiculosum* для экспрессии в растениях *S. tuberosum*. Создана векторная конструкция, которая несет сконструированный синтетический ген *gox* и которая была использована для агробактериальной трансформации листовых эксплантов растений картофеля белорусской селекции сорта Скарб. С помощью чашечного теста, основанного на реакции определения глюкозооксидазной активности, отобраны трансгенные формы растений картофеля, эффективно экспрессирующие модифицированный ген *gox*.

Установлено, что модификация нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* достоверно увеличивает уровень накопления глюкозооксидазы в трансгенных растениях, и это, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации эндогенного пероксида водорода у трансгенных растений, экспрессирующих модифицированный по кодоновому составу ген, по сравнению с трансгенными растениями, которые экспрессируют нативную последовательность гена *gox*. Следует отметить, что достоверное увеличение накопления целевого белка глюкозооксидазы у трансгенных растений, экспрессирующих модифицированный по кодоновому составу

ген *gox*, может оказать позитивное влияние и на защитные свойства от неблагоприятных факторов внешней среды у этих линий трансгенных растений за счет увеличения уровня эндогенного пероксида водорода, что будет проверено в последующих экспериментах.

Литература

1. Иванюк В. Г., Журомский Г. К. // Картофелеводство. 2007. Т. 12. С. 389–403.
2. Абакионок В. С., Бусько И. И., Ильяшенко Д. А. // Земляробства і ахова раслін. 2011. №4. С. 38–40.
3. Wu G., Shortt B. J., Lawrence E. B. et al. // The Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1357–1368.
4. Kachroo A., Zuhua H., Zhu Q. et al. // Transgenic Research. 2003. Vol. 12. P. 577–586.
5. Maruthasalam S., Liu Y. L., Sun C. M. et al. // Plant Cell Rep. 2010. Vol. 29. P. 1035–1048.
6. Maruthasalam S., Lin C. H. // Asian Journal of Plant Sciences. 2013. Vol. 12. P. 128–136.
7. Савчин Д. В., Панюш А. С., Картель Н. А. // Молек. и прикл. генетика. 2011. Т. 12. С. 49–55.
8. Савчин Д. В., Панюш А. С., Картель Н. А. // Вестн. БГУ. Биология. 2012. №3. С. 59–62.
9. Савчин Д. В., Панюш А. С., Картель Н. А. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2012. №4. С. 16–19.
10. Семашко Т. В., Михайлова Р. В., Еремин А. Н. // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39, №4. С. 419–426.
11. Патрушев Л. И. // Экспрессия генов. М., 2000.
12. Murray E. E., Lotzer J., Eberle M. // Nucleic Acid Research. 1988. Vol. 17. P. 477–498.
13. Wolff S. P. // Methods Enzymol. 1994. Vol. 233. P. 182–189.
14. Chen P. Y., Wang C. K., Soong S. C. et al. // Molecular Breeding. 2003. Vol. 11. P. 287–293.

D. V. SAUCHYN, T. N. VERESOVA, O. A. MEZHINA, A. S. PANUSH, A. O. VYACHESLAVOVA,
I. V. GOLDENKOVA-PAVLOVA

CODON OPTIMIZATION OF THE FUNGAL *PENICILLIUM FUNICULOSUM* *GOX* GENE FOR HIGH-LEVEL EXPRESSION IN *SOLANUM TUBEROSUM* PLANTS

Summary

The native *gox* gene encoding glucose oxidase (GOX) was isolated from the genomic DNA of *Penicillium funiculosum*. For high-level expression of the *P. funiculosum* GOX in *S. tuberosum*, low-usage codons were replaced by high-usage ones. The optimized gene was synthesized and cloned under the control of a CaMV 35S promoter into the plant transformation vector. Potato plants were transformed via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure by selecting for kanamycin resistance. Stable integration and expression of the optimized *gox* gene in the transgenic potato lines were ascertained by molecular and biochemical tests. Using codon optimization technique, the expression level of the native *P. funiculosum* *gox* gene in *S. tuberosum* plants was improved 20 %.