

УДК 602.6:577.1;632.9

**Тараненко А.М., Марковський О.В., Моргун Б.В.**

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03680*

*E-mail: rotenar@rambler.ru*

## **СТВОРЕННЯ ЕКСПРЕСУЮЧИХ КОНСТРУКЦІЙ НА ОСНОВІ ГЕНУ *CRY1A(B)*, ПРОДУКТ ЯКОГО НАДАЄ СТІЙКОСТІ ДО ЛУСКОКРИЛИХ (*LEPIDOPTERA*)**

*cry1A(b)* – бактеріальний ген, продукт якого показує високу ефективність у боротьбі з *Lepidoptera*. Було створено трансформаційні події кукурудзи, що містять цей ген, і набули глобального поширення: VT11, Event 176 (Syngenta Seeds), MON810, MON80100 (Monsanto). Приймаючи до уваги чутливість значної кількості шкідників до токсину *cry1A(b)*, перспективним є перенесення гену на інші культурні види. На цей час існує велика зацікавленість наукової спільноти України у отриманні різноманітних генетичних векторів, орієнтованих як на трансформацію злаків, так і дводольних рослин. Метою даної роботи було створення конструкцій, що забезпечували б стабільну експресію у дводольних рослинах. Експресуючі вектори pICBV16 та pICBV19, що містять селективні гени *nptII* і *bar*, показали високу ефективність при трансформації рослин, які належать до родин *Solanaceae* і *Brassicaceae* відповідно. Саме тому їх було обрано за основу для створення нових конструкцій pICBV16-*cry1A(b)* та pICBV19-*cry1A(b)*.

За первинний матеріал у напрацюванні гену *cry1A(b)* було використано синтетичну послідовність ДНК, оптимізовану для високої експресії у кукурудзі. Значну кількість копій цільового гену було напрацьовано внаслідок проведення ПЛР з праймерами m8f, m8r. Отриманий ген лігувався у клонуєний вектор pTZ57R/T (набір InsTAclone™ PCR Cloning Kit, Fermentas). Особливості розміщення сайтів рестрикції у структурі гену не дозволили прямого клонування до експресуючих векторів. Плазміда pTZ57R-*cry1A(b)* використовувалася для трансфор-

мації хімічно-компетентних клітин *E. coli* XL1-Blue (набір TransformAid™ Bacterial Transformation Kit, Fermentas). Бактеріальна суспензія висівалась на селективне середовище LB, 100 мкг/мл карбеніциліну, з наступним відбором 12 колоній ймовірних трансформантів. З них відбрали 2 клони, які показали наявність рекомбінантної плазмиди бажаного складу. Плазмиди рTZ57R-cryIA(b), виділені з клонів, було піддано препаративній рестрикції ендонуклеазами BamHI і NcoI, з подальшою очисткою із агарозного гелю фрагменту, який відповідає кодуючій послідовності гену *cryIA(b)* (набір Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, Fermentas). Експресуючий вектор рICBV16 було також піддано рестрикції по аналогічним сайтам, для видалення кодуючої послідовності гену *uidA*, з наступною очисткою із агарозного гелю розліненого вектору. Отримані вектор і вставка піддавалися лігуванню, з наступною трансформацією хімічно-компетентних клітин *E. coli* XL1-Blue рекомбінантною плазмидою рICBV16-cry1A(b). Відбір ймовірних трансформантів проводився висівом бактеріальної суспензії на селективне середовище LB, 100 мкг/мл карбеніциліну. Для контролю правильності вбудовування гену *cryIA(b)* до експресуючого вектору використовувався рестрикційний аналіз ендонуклеазами BamHI, NcoI, EcoRI.

Плазмиду рICBV16-cry1A(b) піддано рестрикції ендонуклеазами EcoRI і BamHI, для виокремлення фрагменту 35S пром-cry1A(b), з наступною його очисткою із агарозного гелю. Вектор рICBV19 піддано препаративній рестрикції тими ж, для видалення кодуючої послідовності гену *uidA* і 35S промотора. Очищений з гелю розлінений вектор лігувався із фрагментом 35S пром-cry1A(b), з наступною трансформацією *E. coli* XL1-Blue рекомбінантною плазмидою рICBV19-cry1A(b).

Таким чином, було створено дві конструкції, які містять ген *cryIA(b)*, і здатні забезпечити стабільну експресію у *Solanaceae*, *Brassicaceae* та інших дводольних, при трансформації яких можуть бути використані селективні агенти канаміцин та фосфінотрицин.