

## Генетическая трансформация растений

- Генетическая трансформация Резуховидки Таля



Резуховидка Таля



### Методы и материалы:

Метод трансформации	Метод погружения соцветий
Генотип:	Дикий тип <i>Columbia</i> , различные мутантные линии
Расходные материалы:	Вектор ( подробные характеристики :размер вставляемого фрагмента, маркер селекции в бактериях и растениях) или бактериальная суспензия <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , а также праймеры для скрининга
Метод отбора:	Наличие стабильных систем <i>Agrobacterium</i> -опосредованной трансформации для различных растений-объектов при использовании антибиотиков: гигромицин, фосфинотрицин, канамицин, манноза
Результаты эксперимента:	1. Фотографии, иллюстрирующие процесс генетической трансформации и отбора. 2. Семена поколения T1



- Генетическая трансформация табака



Табак Бентама



Методы и материалы:

Метод трансформации:	Трансформация листовых дисков
Генотип:	Табак Бентама ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ), NC89, K326
Расходные материалы:	Готовый (сконструированный) вектор для трансформации табака
Метод отбора:	Гигромицин, фосфинотрицин, канамицин, манноза
Краткое описание технологии	<p>В качестве реципиентного (целевого) материала для трансгеноза используются диски листьев или сегменты стеблей. Экспланты инфицируются агробактерией (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>), несущей вектор с целевым геном, что приводит к встраиванию Т-ДНК в геном растения. После отбора на селективной среде с соответствующим антибиотиком происходит дифференциация и регенерация растений, дающая независимые трансгенные линии.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Подготовка вектора</li> <li>2. Инфицирование эксплантов агробактерией</li> <li>3. Отбор</li> <li>4. Получение семян поколения T0</li> <li>5. Выращивание растений T0 и отбор</li> <li>6. Анализ побегов</li> <li>7. Сбор семян поколения T1</li> </ol>



<p>Результаты эксперимента:</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Для каждой стандартной трансформации предоставляются положительные (трансгенные) линии. Дополнительно может быть сделано любое количество независимых трансгенных линий.</li> <li>2. Положительные (трансгенные) растения или семена, экспериментальные данные и изображения.</li> </ol>
---------------------------------	--

- Генетическая трансформация томата



Томат

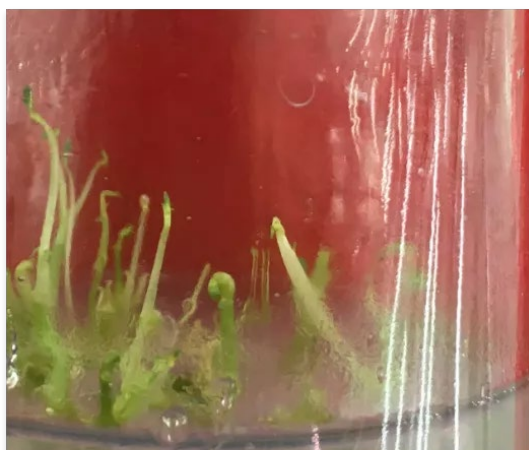


Методы и материалы:

<p>Метод трансформации:</p>	<p><i>Agrobacterium</i>-опосредованная трансформация</p>
<p>Генотип:</p>	<p><i>MicroTom, Ailsa Craig, Moneymaker</i></p>
<p>Расходные материалы:</p>	<p>Готовый (сконструированный) вектор для трансформации томата</p>
<p>Метод отбора:</p>	<p>Наличие стабильных систем <i>Agrobacterium</i>-опосредованной трансформации для различных растений-объектов. Антибиотики : гигромицин, фосфинотрицин, канамицин, манноза</p>
<p>Результаты эксперимента:</p>	<p>Положительные (трансгенные) растения поколения T<sub>0</sub>, семена поколения T<sub>1</sub></p>

<https://www.biovivo.com.cn/col.jsp?id=114>

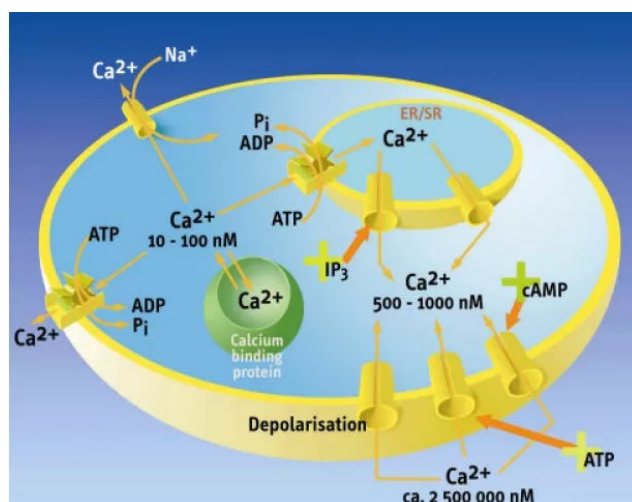
- Генетическая трансформация картофеля



Картофель

Метод трансформации:	Agrobacterium-опосредованная трансформация
Генотип:	<i>Desiree, Longshu 7, Atlantic, Qingshu 9</i>
Расходные материалы:	Готовый (сконструированный) вектор для трансформации томата
Метод отбора:	Антибиотики : гигромицин, фосфинотрицин, канамицин, манноза
Результаты эксперимента:	Трансгенные растения поколения T0, семена поколения T1

### Технология визуализации растений *in vivo* в режиме реального времени



Сигнальная трансдукция с участием  $\text{Ca}^{2+}$  у растений

Помимо того, что кальций ( $\text{Ca}^{2+}$ ) является необходимым элементом питания для растений, он также выполняет функцию защиты клеточных мембран, стабилизируя их структуру и мембранные белки. Кроме того,  $\text{Ca}^{2+}$  служит важнейшим вторичным мессенджером внутри растительных клеток, играя ключевую роль в передаче сигналов в ответ на различные биотические и абиотические стрессы. Многочисленные исследования уже показали, что  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализация играет существенную роль в реакции растений на низкотемпературный стресс.

Материалы и методы:

Метод детекции с использованием Экворина (Aequorin): Основан на реакции биолюминесценции, возникающей при связывании данного белка с ионами кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Интенсивность свечения прямо пропорциональна концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и может быть измерена с помощью высокочувствительной камеры (например, CCD-камеры).

- Конструирование вектора для трансформации резуховидки Таля

- Генетическая трансформация
- Обработка растений субстратом и скрининг по люминесценции
- Получение семян

Требования к плазмиде:

- Концентрация: 80–100 нг/мкл;
- Объем:  $\geq 10$  мкл;
- Плазида должна быть без признаков деградации. Деградация плазмиды может негативно повлиять на ход последующих экспериментов. Во избежание этого при транспортировке рекомендуется использовать лед или сухой лед.

Требования к культуре *Agrobacterium*:

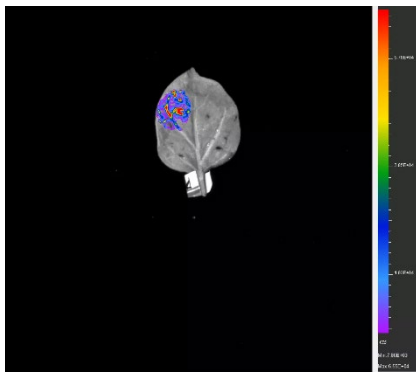
1. В ходе выполнения эксперимента используется ,как бактериальный раствор, так и культура на чашке Петри. Раствор должен быть свежеактивированным и замороженным в глицерине. Культура на чашке должна быть активирована не более, чем за неделю до начала эксперимента.

2. По умолчанию в эксперименте используется дикий тип резуховидки Таля *Columbia* в качестве реципиентного материала для трансформации, также возможно использование . в качестве реципиента мутантные линии или другие сорта.

3. завершения работы является получение положительного результата ПЦР-анализа на наличие трансгена.

Результат на выходе:  $\geq 5$  независимых трансгенных линий.

### Изучение взаимодействие белков в растении



Система визуализации растений *in vivo* позволяет визуализировать свечение листьев или других органов растений для исследования взаимодействия между белками в растительном организме. Визуализация с использованием комплементации люциферазы светлячка (Firefly Luciferase Complementation Imaging, LCI) — это современная методика, сформировавшаяся в последние годы для изучения взаимодействия белков

Материалы и методы:

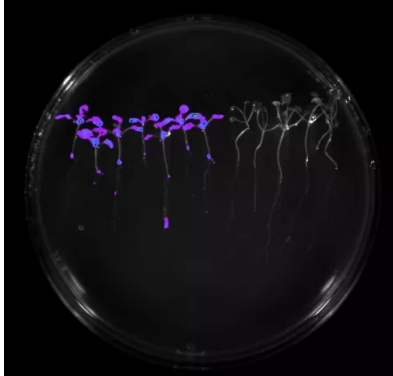
Суть метода заключается в том, что два целевых белка соединяются соответственно с С-концевым (CLuc: 398–550 aa) и N-концевым (NLuc: 2–416aa) фрагментами люциферазы светлячка. Если два целевых белка взаимодействуют, то фрагменты NLuc и CLuc люциферазы сближаются в пространстве и правильно собираются, восстанавливая активность фермента, то есть способность расщеплять субстрат с испусканием света. Сочетание технологии LCI с методом транзientной экспрессии в листьях табака позволяет при исследовании взаимодействия растительных белков достичь следующих преимуществ: проведение количественного анализа в реальном времени непосредственно в живых клетках; отсутствие помех со стороны автофлуоресценции растений; простота операции — метод не требует лизиса клеток и экстракции белков, что позволяет более точно отражать состояние взаимодействия белков в условиях, близких к физиологическим.

Результаты:

1. Конструирование растительного экспрессионного вектора (гибридный белок)- Трансформация *Agrobacterium tumefaciens*
2. Инфильтрация листьев табака: инъекция раствора агробактерий в листья *Nicotiana benthamiana*

3. Визуализация *in vivo*: регистрация экспрессии целевого белка с помощью системы биолюминесцентной визуализации
4. Анализ данных и получение результатов

### Отбор клонов растений



Генетическая трансформация растений является ключевым методом современной молекулярной биологии растений и генной инженерии, широко применяемым в таких областях, как улучшение сельскохозяйственных культур, исследования функций генов и биофармацевтика. Предварительным условием для проведения дальнейших исследований является получение высокоэкспрессирующих трансгенных линий из большого числа трансформантов. Традиционные методы скрининга (такие как ПЦР, вестерн-блоттинг и др.) не только требуют значительных временных и трудовых затрат, но и сопряжены с высокими расходами. В

отличие от них, технология визуализации растений *in vivo* предлагает эффективный и наглядный метод скрининга, позволяющий проводить быстрый анализ большого количества образцов одновременно, что существенно повышает как эффективность отбора, так и его чувствительность.

#### Материалы и методы:

После проведения трансформации получение семян поколения T<sub>0</sub>, несущих целевой ген, осуществляется путем скрининга на основе интенсивности биолюминесцентного сигнала после обработки растений субстратом.

#### Результаты:

1. Конструирование вектора
2. Генетическая трансформация
3. Обработка растений субстратом и скрининг по люминесценции
4. Получение готовых семян

### Субклеточная локализация

#### Материалы и методы:

- Предоставление плазмиды или культуры агробактерии
- Трансформация резуховидки Таля или инфильтрация листьев табака с использованием агробактерии
- Проведение анализа субклеточной локализации
- Микроскопическое исследование с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

#### Результаты:

1. Карта конструкции вектора, его полная нуклеотидная последовательность и аннотация
2. Результаты секвенирования участка встройки
3. Готовый вектор и соответствующая бактериальная культура-носитель,
4. Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии для публикации SCI.

