

**ЮНЕСКО
КОМИССИЯ
УКРАИНСКОЙ ССР
ПО ДЕЛАМ ЮНЕСКО**



**АКАДЕМИЯ НАУК
УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ
им. Н. Г. ХОЛОДНОГО**

МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

Препринт 88.2

**Киев
1988**

ЮНЕСКО

Комиссия
Украинской ССР
по делам ЮНЕСКО

АКАДЕМИЯ НАУК
УКРАИНСКОЙ ССР

Институт ботаники
им. Н.Г.Холодного

МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

Препринт 88.2

Киев
1988

МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ - Киев, 1988. - 23 с. -
(Препринт / АН УССР, Институт ботаники; 88.2)

Момот Василий Павлович, Кучук Николай Викторович, Пастернак
Тарао Петрович

В работе описаны методы клеточной и генетической инженерии растений. Они включают методы соматической гибридизации и генетической трансформации у высших растений. Методы описаны в модификациях, применяемых в отделе цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР.

Для специалистов в области клеточной и генетической инженерии растений.

Клеточная и генетическая инженерия растений к настоящему времени накопила значительный материал и постепенно превращается из академической дисциплины в одну из наиболее разрабатываемых и многообещающих в практическом отношении областей биотехнологии. В первую очередь это связано с расширением круга растений, имеющих сельскохозяйственное значение, доступных для манипуляций на клеточном уровне. Кроме того, интерес к генетической инженерии высших растений возрос в связи с появлением клонированных индивидуальных генов бактериального и растительного происхождения, имеющих практическое значение.

Очевидно, что развертывание исследований по клеточной и генетической инженерии растений невозможно без подготовки специалистов в этой области. В то же время в СССР очень мало практических пособий, в которых подробно были бы описаны основные методы, применяемые в клеточной и генетической инженерии растений. Хотя за рубежом и издан ряд хороших пособий (ссылки на некоторые из них приведены в списке литературы), они, к сожалению, не всегда доступны для исследователей в нашей стране. Данная работа предназначена для того, чтобы хотя бы в какой-то степени восполнить этот пробел.

Все методы, представленные в этом препринте, описаны в тех модификациях, в которых они применяются в отделе цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР сотрудниками отдела (Момот В.П., Кучук Н.В., Пастернак Т.П.). В конце работы приведен список литературы, в которой можно найти описание методов и их модификаций, более подходящих для тех или иных целей и объектов.

В этой небольшой работе мы не ставили задачи описать все методы, применяемые в клеточной и генетической инженерии растений. Однако мы надеемся, что приведенные методы позволят начинающему исследователю ориентироваться среди большого числа существующих методик. Если же будет обнаружено, что мы упустили какие-то важные моменты, авторы с благодарностью примут любые замечания и пожелания.

СЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ, МЕХАНИЧЕСКАЯ ИЗОЛЯЦИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЕДИНИЧНЫХ ГЕТЕРОКАРИОЦИТОВ

Все работы по созданию новых, более совершенных растительных форм до последнего времени проводились лишь путем полового скрещивания растений и последующего отбора желаемых генотипов, что накладывало ряд ограничений как на возможности комбинирования генов, так и на скорость селекционного процесса. Разработанная за последнее время технология соматической гибридизации высших растений путем слияния протопластов и регенерации продуктов слияния до целых растений позволяет обойти часть ограничений, свойственных половому процессу и открывает заманчивые перспективы перед генетиками, физиологами, биохимиками растений и селекционерами. Применение методов соматической гибридизации позволяет успешно преодолевать естественную нескрещиваемость филогенетически отдаленных видов растений и, кроме того, создавать дополнительные резервы наследственной изменчивости. К настоящему времени опубликовано более 200 работ описывающих результаты изучения различных соматических гибридов и позволяющих выделить три основные направления исследований по соматической гибридизации высших растений:

- 1) изучение и реконструкция плазматенов;
- 2) исследования по гибридизации клеток филогенетически отдаленных видов растений;
- 3) получение гибридного материала, представляющего практический интерес для селекционеров.

В зависимости от поставленной задачи исследователем могут быть использованы самые разнообразные методы селекции соматических гибридов /1/, но мы в предлагаемой ниже методике рассмотрим лишь метод механической изоляции индивидуальных продуктов слияния с последующим их культивированием – прием, не связанный с выраженным отбором тех или иных рекомбинантных форм из общего спектра возникающих при слиянии клеток протопластов.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

I. Оборудование:

- ламинарный бокс;
- инвертированный микроскоп;
- центрифуга на 1000 об/мин;
- полуавтоматическая микропипетка на 1 мкл.

2. Растительный материал:

- асептически выращиваемые растения;
- каллусные культуры.

3. Химические реактивы:

- ферментные смеси и среды для выделения протопластов по стандартным методикам /2/;
- 0,45 М раствор маннитола;
- 0,5 М раствор сахарозы;
- раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) (состав указан в тексте);
- буферный раствор (состав указан в тексте);
- питательные среды М0-1 /3/ (состав среды указан в тексте).

4. Лабораторная посуда и инструменты:

- чашки Петри;
- чашки Купрака;
- наконечники для микропипеток;
- лабораторная посуда и инструменты для выделения и культивирования протопластов по стандартным методикам.

Все перечисленные растворы, материалы и инструменты используются стерильными.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В опытах по соматической гибридизации с дальнейшей механической изоляцией гибридов необходимо научиться четко, однозначно идентифицировать гибридные клетки, находящиеся в смеси с родительскими партнерами. Для таких опытов обычно берутся партнеры, обладающие визуальными маркерами, т.е. партнеры, один из которых представлен каллусными протопластами (богатыми цитоплазмой с ярко выраженными цитоплазматическими тяжами и хорошо видимым ядром), а другой – мезофильными протопластами (зеленые пластиды, мало цитоплазмы, большая вакуоль) /3/.

Источником получения каллусных протопластов могут быть как овещиндуцированные (1-2 пассажа), так и длительно выращиваемые каллусные ткани, предварительно прошедшие 2-3 пассажа на агаризованных или жидких питательных средах в темноте при 25-28°C в течение 10-14 дней. Материалом для получения мезофильных протопластов могут служить листья растений, растущих в поле или в теплице, но в этом случае необходима их стерилизация. Более удобны для работы листья асептически выращиваемых в вегетативной комнате рас-

тений. Состав питательных сред для культивирования растительного материала, а также условия освещенности асептически выращиваемых растений играют существенную роль в процессах ферментативного выделения и способности к клеточному делению полученных протопластов и обычно подбираются исследователем экспериментальным путем.

В качестве осмотика при приготовлении ферментных смесей можно использовать 0,45 М раствор маннитола, 0,5 М раствор сахарозы или солевую среду w-5.

Состав среды w-5:

1. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 18,4 г
2. NaCl - 9 г
3. KCl - 0,4 г
4. глюкоза - 1 г
5. H_2O - 1 л

Обычно для получения большого количества протопластов из каллусного материала используют ферментную смесь, приготовленную на основе среды w-5, а мезофильных - на 0,45 М растворе маннитола или 0,5 М сахарозе. Для синхронного выделения каллусных и мезофильных протопластов применяют разные концентрации ферментов, а сам процесс ферментации проводят при 20-25°C в течение 10-16 часов в темноте.

Выделенные протопласты фильтруют через воронку с капроновой сеткой с диаметром пор 60-100 мкм и фильтрат центрифугируют 3-4 минуты при 500-700 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, протопласты ресуспендируют в 10 мл среды w-5 или 0,45 М растворе маннитола и повторяют процедуру 1-2 раза. Иногда необходима очистка протопластов с применением 0,5 М сахарозы, позволяющая в процессе центрифугирования удалить из суспензии протопластов разрушенные клетки и остатки клеточных стенок, препятствующих проведению процесса слияния.

Слияние протопластов

Индукированное слияние растительных протопластов проводят обычно по методике "ПЭГ-высокий pH-высокое содержание Ca^{2+} ".

Отмытые от ферментного раствора каллусные и мезофильные протопласты смешивают в соотношении 1:1 или 2:1 в конечном объеме суспензии 1-2 мл. "Густую" суспензию протопластов пипеткой наносят в чашки Петри диаметром 4 см и оставляют на 10-20 мин для осаждения. Диаметр наносимой капли равен примерно 1 см. Через 10-20 мин к смеси осевших на дно чашки Петри добавляют осторожно сверху или с боков 1-3 капли раствора ПЭГа и выдерживают 5-25 мин.

Состав раствора ПЭГа:

1. Глюкоза	- 2000 мг;
2. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 150 мг;
3. KH_2PO_4	- 10 мг;
4. ПЭГ м.в. 6000-	- 50 г. (можно использовать ПЭГ с м.в. от 2000 до 6000);
5. H_2O	- 100 мл.

Под воздействием раствора ПЭГа происходит слипание и агрегация родительских протопластов, оцепленных о дном чашки Петри. Они меняют свою сферическую форму и слегка плазмолизуются, а одно - временным превращением двух-трёхслойного осадка протопластов в однослойную "сеточку".

Через 20-25 мин. к препарату, обработанному ПЭГом добавляют буферный раствор (высокий pH - высокое содержание Ca^{2+}) по 5-6 капель. Процедуру повторяют через 10 мин. еще дважды. В зависимости от конкретного растительного материала разбавление буферной смеси можно проводить однократно, добавляя при этом 0,5-1 мл. буферной смеси на чашку.

Состав буферной смеси:

1. Натрий-глициновый буфер	- 10 мл; ^x
2. Глюкоза	- 1200 мг;
3. ДМСО (диметилсульфоксид)	- 2 мл;
4. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 266 мг;
5. H_2O	- до 20 мл.

x состав: 380 мг. глицина растворить в 50 мл. H_2O и довести до 100 мл. 0,1 М раствором NaOH, pH - 10,5.

После 30 мин. обработки препарата буферной смесью, раствор ПЭГ-буфер осторожно отбирают пипеткой, не оголяя слоя протопластов и троекратно с интервалом в 5-10 мин. отмывают питательной средой М0-1 общим объемом 8-10 мл. В дальнейшем смесь гибридных и родительских протопластов культивируют в тонком слое питательной среды М0-1 (1 мл.) на рассеянном овете при температуре 25°C 3-10 суток / 2, 3, 4 /.

Состав питательной среды М0-1:

1. Макро NT	- 250 мл;
2. Микро MC	- 1 мл;
3. Fe- хелат	- 10 г;

4.Сахароза	-	10 г;
5.Мезоинозитол	-	100 мг;
6.Маннитол	-	62 г;
7.Глюкоза	-	10 г;
8.В _I	-	2 мг;
9.В ₆	-	2 мг;
10.Биотин	-	0,5 мг;
11.Никотиновая кислота	-	2 мг;
12.Пролин	-	2 мг;
13.Гидролизат казеина	-	300 мг;
14.Дрожжевой экстракт	-	300 мг;
15.Альбумин яичный	-	200 мг;
16.Нафтилуксусная кислота	-	2 мг;
17.Индолилуксусная кислота	-	1 мг;
18.2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота	-	1 мг;
19.6-бензиламинопурин	-	1,5 мг;
20.Зеатин	-	0,1 мг;
21.Вода	-	до 1 л.

pH - 5,6-5,8.

Пропиции приготовления макро NT и микро MC представлены в /2/. Питательную среду M0-I стерилизуют фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2-0,4 мкм.

Механическая изоляция и культивирование индивидуальных продуктов слияния

После проведенного слияния смесь гибридных и родительских протопластов культивируют на богатых органическими компонентами питательных средах до наступления первых делений в гибридных клетках. Обычно гибридные клетки активно делятся на питательных средах, индуцирующих деление каллусных протопластов одного из родителей, хотя подбор оптимальной среды культивирования почти всегда решается эмпирическим путем. За 2-12 часов до начала работ по механическому отлову единичных продуктов слияния культуру протопластов необходимо в 5-10 раз разбавить свежей питательной средой и перенести в чашки Петри диаметром 6 см. Одновременно готовить к работе и чашки Купрака. Их внешняя камера заполняется 0,25 М раствором маннитола (для создания необходимой влажности). Номерные ячейки внутренней камеры необходимо заполнить питательной средой объемом 0,5 мл.

Непосредственный отбор гибридных делящихся клеток производят с помощью полуавтоматической микропипетки на 1 мкл.

При помощи инвертированного микроскопа, находящегося непосредственно в стерильной камере ламинарного бокса, идентифицируют продукты слияния, претерпевшие 2-3 деления. Продукты слияния имеют морфологию каллусных клеток, но содержат вокруг ядра и частично в цитоплазме зеленые хлоропласты, происходящие от мезофильных протопластов второго родителя. Отлов клеток производят при увеличении 100-200, что позволяет быстро вводить кончик наконечника микропипетки в поле зрения к гибридной делящейся клетке. После подводки наконечника к клетке начинают медленно втягивать 1 мкл. среды с данной клеткой. Отобранную клетку помещают в номерную ячейку внутренней камеры чашки Купрака, осторожно выдавливая плавающую клетку с 1 мкл. среды, держа при этом микропипетку вертикально и не касаясь концом наконечника дна ячейки. В чашке Купрака делящиеся гетерокарициты культивируют 6-8 дней, после чего необходимо в каждую ячейку добавить по 1 мкл. свежей среды. Через 14-20 дней образовавшиеся гибридные колонии можно поместить в капли (100-200 мкл.) свежей питательной среды и постепенно (через 5-6 дней) пересадить на среду с пониженной концентрацией осмотика (по схеме 0,45М-0,3М-0,2 М).

Колонии гибридных клеток после 7-дневного роста на жидкой питательной среде с 0,2 М осмотиком можно, разделив на 2 части каждый клон, одну часть перенести на агаризованные питательные среды с цитокининами для индукции органогенеза, а клетки другой части использовать для цитогенетического анализа с целью изучения числа и морфологии хромосом и доказательства гибридности по клеточному ядру.

В ряде случаев, в зависимости от использования конкретного растительного материала, удается довольно четко идентифицировать гибридные клоны на стадии 10 и более клеток. Тогда операцию по механическому изолированию можно упростить, высаживая отловленные клоны в капли полужидкой среды для культивирования объемом 30 - 50 мкл. Подобные среды готовятся путем добавления к жидкой питательной среде 0,2% агарозы или агара. Миникапли наносят микропипеткой в чашку Петри диаметром 4 см. в количестве 10-15 ед., предварительно заполнив полужидкой средой боковое пространство по периметру для поддержания необходимой влажности. Через 15-20 дней проводят пересадку микроколоний на среду с пониженной концентрацией осмотика по схеме, описанной ранее.

Возникшая сравнительно недавно генетическая инженерия растений приобретает все большее как фундаментальное, так и прикладное значение. В эти исследования вовлекаются все больший круг ученых. В настоящее время у довольно значительного числа растительных видов получены трансгенные растения. Среди них такие хозяйственно ценные виды как хлопчатник, картофель, томаты, рапс, подсолнечник, люцерна, клевер /5/. Получены первые сообщения о трансформации видов из семейств злаковых и бобовых, имеющих первостепенное значение для сельскохозяйственной практики.

Успехи генной инженерии позволили проклонировать гены как про- так и эукариот, имеющих важное практическое значение. Это различные гены устойчивости к гербицидам, насекомым, вирусам. Полученные гены были введены в различные виды растений, получена их фенотипическая экспрессия. Трансгенные растения, имеющие эти гены, в настоящее время начинают использоваться в селекционной практике.

Большое значение имеет генетическая инженерия растений в получении фундаментальных знаний. Так было показано, что многие физиологические реакции растений, такие как светорегуляция или тканеспецифический синтез белков, опосредуются на уровне промоторов генов. Причем уже расшифрованы нуклеотидные последовательности, несущие эти функции / 6/.

Достижения генетической инженерии растений были бы невозможны без развития методов введения чужеродной генетической информации в растительную клетку. Эти методы позволили встраивать гены как прокариотического, так и эукариотического происхождения, но под контролем эукариотических регуляторных элементов, в геном растений и получать стабильную фенотипическую экспрессию. Введенная чужеродная генетическая информация встраивается в геном растений и стабильно наследуется в поколениях как доминантный признак.

Методы генетической трансформации растений условно можно разделить на две группы. Первая группа методов ("кокультивирование" и "листовые диски") основана на природной способности почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* вводить свой генетический материал в растения / 7, 8, 10 /. Эти методы достаточно просты в применении, и у большинства вышеперечисленных культур генетическая

трансформация была получена с помощью агробактерий. В то же время они имеют и некоторые ограничения. Так, у злаковых культур не удалось до сих пор четко доказать генетическую трансформацию, опосредованную агробактериями. Кроме того, всегда имеются некоторые сложности с элиминацией самих агробактерий, причем некоторые культуры довольно тяжело переносят совместное культивирование с бактериями и часто гибнут.

Другая группа методов, к которой относится "прямой перенос генов", предполагает физическое преодоление мембранного барьера у протопластов растений /9/. Эти методы обеспечивают абсолютную стерильность, что позволяет надежно тестировать события трансформации. Они применимы во всех случаях, когда отработана система культивирования растительных протопластов, что, конечно, накладывает определенные ограничения на эти методы.

Таким образом, овладение всем арсеналом приемов и методов генетической трансформации растений позволит исследователю успешно решать поставленные задачи.

Предлагаемые вашему вниманию методики разработаны в основном для видов из семейства пасленовых, в частности для табака.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Оборудование:

- ламинарный бокс;
- инвертированный микроскоп;
- настольная центрифуга с максимумом ускорения до 1000 g;
- источник напряжения до 1000-2000 В с системой ограничения по току, (ЛКБ, Швеция) или специальный прибор для электропорации (ВТХ, США).

2. Биологический материал:

- культура протопластов растений;
- стерильные растения;
- культура *Agrobacterium tumefaciens*;
- плазмидная ДНК, содержащая селективный ген под эукариотическим промотором.

3. Химические реактивы:

- ферментные растворы и среды для выделения и культивирования протопластов по стандартным методикам;
- раствор 0,4 М маннитола, содержащий 6 мМ $MgCl_2$;
- раствор 0,3 М $MgCl_2$;

- раствор ПЭГа м.в. 6000 в 0,4 М маннитоле;
- регенерационная питательная среда R для листьев табака;
- питательная среда YTA для роста бактерий;
- растворы клафорана 20 мг/мл, карбенициллина 20 мг/мл, канамицинсульфата 20 мг/мл.

Подробный состав растворов и питательных сред указан ниже.

4. Лабораторная посуда и инструменты, необходимые для работы с протопластами и клетками по стандартным методикам. Все вышеперечисленные растворы, материалы, инструменты, за исключением оборудования, используются стерильными.

Метод "листовых дисков"

Для работы используют стерильные растения табака. Листья нарезаются полосками или дисками диаметром 2-3 мм и помещают на поверхность жидкой питательной среды для регенерации R. К этим листьям в тот же день добавляют свежую ночную культуру агробактерий - примерно 1 мл на чашку диаметром 100 мм, содержащую 8-10 мл среды. Зараженные листья помещают в термостат и культивируют при 28°C от 24 до 48 часов. После инкубации листья обмывают стерильной водой и высушивают фильтровальной бумагой. Затем листья переносят на агаризованную питательную регенерационную среду R, содержащую 500 мг/л клафорана, 500 мг/л карбенициллина и 50 мг/л канамицинсульфата. Примерно через один месяц образуются темнозеленые точки, а затем побеги. Образовавшиеся побеги переносят на безгормональную питательную среду с клафораном 200 мг/л, карбенициллином 200 мг/л и канамицинсульфатом 100 мг/л. Укоренившиеся растения анализируют. В предлагаемом методе мы не используем подложек из клеточных культур других растений, как это описано в литературе, так как это усложняет процедуру и не дает значительного увеличения частоты трансформации.

Метод "листовых дисков" прост в работе и позволяет стабильно получать значительные количества генетически трансформированных растений независимого происхождения. В то же время при применении этого метода к другим видам растений необходимо вводить некоторые модификации, связанные с особенностями культивирования *in vitro* этих видов.

Метод кокультивирования протопластов растений с *Agrobacterium tumefaciens*

Очищенные протопласты табака переносят в среду для культивирования с 0,4 М сахарозой в качестве осмотика. Протопласты инку-

бируют при обычных условиях в течение трех суток до появления первых делений. Затем к ним добавляют свежую ночную культуру агробактерий из расчета 100-200 бактерий на протопласт. Совместное кокультивирование продолжается в течение 36-48 часов в термостате при 28°C. В первые часы кокультивирования можно под микроскопом наблюдать прикрепление агробактерий к клеточной стенке протопластов. После окончания кокультивирования к культуре протопластов добавляют ферментный раствор, используемый для выделения протопластов, с целью разделения образовавшихся сгустков. Через 2-3 часа протопласты отмывают дважды раствором MgCl_2 и переносят в свежую питательную среду для дальнейшего культивирования с добавлением 500 мг/л клафорана и 500 мг/л карбенициллина. Протопласты культивируют по стандартным методикам в течение трех-четырех недель. Затем микроколонии переносят на агаризованную питательную среду с клафораном 200 мг/л, карбенициллином 200 мг/л и канамициносulfатом 50 мг/л. Продолжающие рост в этих условиях колонии переносят на свежие регенерационные питательные среды с 100 мг/л канамициносulfата. Полученные таким образом растения анализируют.

Метод кокультивирования растительных протопластов с агробактериями в основном имеет ограниченное применение, так как у большинства растительных видов протопласты с трудом переносят совместное культивирование с бактериями и часто эти эксперименты оканчиваются гибелью культуры. В то же время этот метод позволяет отбирать значительное число трансформантов и в отдельных экспериментах частота трансформации достигает 10^{-3} - 10^{-2} .

"Прямой перенос генов" с помощью электропорации протопластов.
Очищенные протопласты суспендируют в 0,4 М маннитоле, содержащем 6 мМ MgCl_2 и 0,1% МЭС буфера pH 5,6, до конечной плотности $1,2-1,6 \times 10^6$ пр./мл. К суспензии добавляют 40 мкг ДНК тимуса теленка, используемой в качестве носителя. Затем добавляют 0,3 М раствор MgCl_2 (3-5%) так, чтобы сопротивление суспензии было в пределах 1-1,2 кОм. Вносят 10-15 мкг ДНК плазмиды с геном, определяющим селективируемый признак. Вся смесь осторожно перемешивается. Пробирку с протопластами помещают на водяную баню 45°C в течение 5 мин. Затем быстро охлаждают на ледяной бане до температуры 20°C. Суспензию осторожно перемешивают в течение 10 мин, а затем добавляют 24% раствор ПЭГА м.в. 6000 в 0,4 М маннитоле до конечной концентрации 8%. Все содержимое тщательно перемешивают. После 10 мин инкубации смесь переносят в ячейку для электропора-

ции и прикладывают три импульса электрического тока с напряженностью 1-1,2 кВ/см продолжительностью от 1 до 30 мсек. Интервал между импульсами 10 сек. Обычно условия подбираются эмпирически таким образом, чтобы выживаемость протопластов составляла после электропорации 50%. Из камеры для электропорации суспензию протопластов переносят на чашку, инкубируют еще 10 мин, а затем добавляют питательную среду в 10-кратном объеме. Протопласты культивируют по стандартным методикам. Схема отбора трансформантов такая же как и в случае кокультивирования протопластов с агробактериями. Отобранные трансформанты подвергают дальнейшему анализу.

Генетическая трансформация растений с помощью электропорации протопластов позволяет получать высокую частоту трансформации, в некоторых экспериментах до 10^{-1} от числа выживших протопластов. Метод гарантирует абсолютную стерильность, он незначительно влияет на частоту деления выживших протопластов. Этим методом можно тестировать различные генноинженерные конструкции с помощью транскрипционной экспрессии. В то же время основное ограничение, не позволяющее широко использовать этот метод, касается разработки опосредованных выделения и культивирования протопластов различных видов растений. Решение этих проблем по всей видимости расширит область применения этого метода.

Состав питательных сред и растворов

1. Питательная среда YTG для выращивания бактерий:

	на 1 л
гидролизат казеина	10 г
дрожжевой экстракт	1 г
глюкоза	10 г
NaCl	1 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,25 г

2. Раствор для суспандирования протопластов при электропорации:

	на 100 мл
маннитол	7,2 г
$MgCl_2$	0,05 г
МЭС (морфолиноэтансульфоновая кислота)	0,1 г

pH 5,6

3. Раствор ПЭГа для электропорации.

	на 100 мл.
ПЭГ (полиэтиленгликоль)	- 24 г.
м.в. 6000	
Маннитол	- 7,2 г.

4. Регенерационная среда (в) для "листовых дисков".

	на 1 л.
Макро МС	- 100 мл.
Микро МС	- 1 мл.
Fe-хелат	- 5 мл.
Миоинозитол	- 100 мг.
Витамин В _I	- 10 мг.
Витамин В ₆	- 1 мг.
Сахароза	- 10 г.
6-бензиламинопури	- 1 мг.
Нафтилукусная кислота	- 0,1 мг.

рН 5,6-5,8

Прописи приготовления макро и микро МС, Fe-хелата представлены в / 2 /.

К настоящему времени разработан целый ряд методов генетической трансформации высших растений. Наиболее широко применяемые из них - использование естественного механизма трансформации *Agrobacterium tumefaciens* /5/ и прямой перенос молекул ДНК в протопласты под действием различных физических и химических агентов /9, II, I2, I3, I4/.

Метод генетической трансформации высших растений с помощью микроинъекции разработан впервые в 1985 году одновременно в нескольких лабораториях, в том числе и в отделе цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР. К настоящему времени этот способ трансформации пока что не вышел за рамки чисто методических разработок, хотя потенциальные возможности метода, несомненно, очень велики.

Предлагаемый нами метод трансформации с помощью микроинъекции в клетки высших растений /II, I2/ характеризуется рядом преимуществ: универсальностью и стандартностью операций, необходимых для трансформации широкого круга объектов-реципиентов (изолированные протопласты, единичные каллусные клетки, клетки в составе целого растения, многоклеточные структуры) различным молекулярно-генетическим материалом (молекулы ДНК, ядра, хлоропласты или митохондрии), используемым для инъекции, а также высокой эффективностью трансформации (до 50%). Важным преимуществом метода, по нашему мнению, является возможность работы с изолированными микроспорами и клетками пыльцы. Относительно низкая производительность метода микроинъекции (до 50 инъекций в час) в достаточной степени компенсируется высокой эффективностью трансформации. К недостаткам метода можно отнести необходимость наличия достаточно сложного приборного оборудования.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

I. Основное оборудование:

- комплект микроманипуляторов КМ-2^{*});
- микроскоп с неподвижным столиком (типа МБИ-3 или МБИ-9);
- бокс для стерильных работ (КПГ-I или УОБГ);
- прибор для вытягивания капилляров ПВК-I^{*});
- микрокузница МК-I^{*}).

^{*}) производство ЭЗНП АН СССР, г.Черноголовка

Материалы: стеклянные трубки диаметром 2-3 см, необходимые для вытяжки капилляров или же готовые капилляры.

2. Материалы, оборудование и химические реактивы, необходимые для ведения культуры клеток растений *in vitro*.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

I. Подготовительные операции:

- установка комплекта манипуляторов КМ-2 и микроскопа в ламинарном боксе для стерильных работ;
- изготовление капилляров диаметром 1-2 мм из стеклянных заготовок диаметром 1-2 см (на приборе ПВК-1);
- изготовление микроинструментов - микроиглол с диаметром кончика 1-3 микрометра, микроприсоски диаметром 20-100 микрометров, микропипетки для отбора инъцированных клеток (на приборе МК-1);
- подготовка объекта-реципиента (клетки, полученные из протопластов, клетки суспензионной культуры, изолированные микроспоры) и трансформирующего фактора (ДНК) (по стандартным методикам);
- подготовка вспомогательного оборудования, необходимого для проведения опыта (микрокамера для проведения микроинъекции, состоящая из предметного стекла, стеклянных столбиков и наклеенного на них покровного стекла; пипетки для заполнения камеры; вазелиновое масло);
- силиконизация камеры;
- стерилизация микроинструмента и вспомогательных приспособлений.

2. Протокол проведения опыта

- установка камеры в держатель на предметном столике микроскопа;
- фиксация микроинструментов в держателях;
- заполнение микроиглы вазелиновым маслом (с помощью гидравлической системы, состоящей из шприца и тефлоновых трубок);
- нанесение в камеру суспензии клеток объемом 1-2 микролитра (чтобы в камере находилось 15-20 клеток и быстрое заполнение камеры вазелиновым маслом во избежание подсыхания суспензии);
- нанесение в другой отсек камеры трансформирующего фактора: в случае введения чужеродной ДНК - капля раствора ДНК объемом 0,1-1 микролитр, в случае использования клеточных органелл - кап-

ля суспензии клеток-доноров, органеллы которых предполагается использовать.

Все дальнейшие операции производят под визуальным контролем, осуществляемым с помощью микроскопа.

- заполнение микроиглы трансформирующим фактором (в случае раствора ДНК - введение кончика микроиглы в каплю с раствором ДНК и набор раствора в кончик микроиглы, в случае клеточных органелл - фиксация клетки-донора с помощью микроприсоски, введение в соответствующий компартмент клетки (ядро или цитоплазма) кончика микроиглы и введение соответствующих органелл в кончик микроиглы;

- фиксация объекта-реципиента с помощью микроприсоски и введение в его соответствующий компартмент (ядро или цитоплазма) кончика микроиглы;

- введение в объект-реципиент раствора, содержащего трансформирующий фактор (заполнение кончика микроиглы раствором трансформирующего фактора, равно как и введение раствора в объект-реципиент, производят с помощью гидравлической системы);

- после инъектирования всех клеток в данной камере - отлов клеток с помощью микропипетки и перенос их в чашку Петри в микрокаплю объемом 0,5-1 мкл под слой вазелинового масла.

Описанные выше операции выполняются в стерильных условиях.

3. Доказательство события трансформации

Инъектированные клетки культивируют в микрокаплях, разбавляя их по мере необходимости свежей питательной средой. Полученные клеточные линии и растения тестируют на наличие признаков, кодируемых введенными трансформирующими факторами, а также проводят молекулярно-биологические и биохимические анализы.

В описанном выше протоколе проведения опыта не указываются конкретные объекты, с которыми производятся манипуляции, поскольку метод микроинъекции достаточно универсален. В зависимости от используемых объектов и целей эксперимента изменяются только параметры микроинструментов (диаметр микроприсоски составляет приблизительно половину диаметра клетки-реципиента; диаметр кончика микроиглы в случае введения ДНК составляет 0,5-1 микромметр, а в случае введения клеточных органелл - 2-4 микромметра; диаметр микропипетки для отлова инъектированных клеток составляет 1,5-2 диаметра объектов-реципиентов).

Сравнивая технологию генетической трансформации высших растений с помощью микроинъекции с другими методами трансформации,

можно отметить следующие существенные моменты:

1. Метод трансформации с помощью микроинъекции уступает в технологичности методам прямой трансформации и трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, в тех случаях, когда последние применимы.

2. Метод трансформации с помощью микроинъекции позволяет решать ряд задач по трансформации растений, которые невозможно решить другими методами, например:

- трансформация растений, для которых не разработаны методики выделения, культивирования протопластов и регенерации из них растений и невосприимчивых к инокуляции *Agrobacterium*;

- перенос в клетки изолированных клеточных оргanelл;

- использование для трансформации неселектируемых молекул ДНК;

- использование в качестве объектов-реципиентов гаплоидных клеток - микроспор, из которых в дальнейшем возможна регенерация гаплоидных растений.

1. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. - Киев: Наукова думка, 1984. - 160 с.
2. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. - Киев: Наукова думка, 1985.
3. Момот В.П., Околот А.Н., Череп Н.Н., Скаржинская М.В., Глеба Ю.Ю. Мектрибные гибридные клеточные линии *Nicotiana chinensis*, *Atropa belladonna*, полученные слиянием протопластов // ДАН СССР. - 1982. - 267, № 4. - С. 959-962.
4. Menczel L., Nagy F., Kiss Z., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: correlation and resistance to *Nicotiana tabacum* plastids // TAG. - 1981. - 59, N 1. - P. 191-198.
5. Schell J.St. Transgenic plants as tool to study the molecular organization of plant genes // Science. - 1987. - 237, N 4819. - P. 1176-1182.
6. Willmitzer L. The use of transgenic plants to study plant gene expression//Trends in Genetics.-1988.-4, N 1. - P. 13-18.
7. Marton L., Wullems G., Molendijk K., Schilperoort R. In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*// Nature. -1979. - 277. - P. 129-131.
8. Horsch R., Fry J., Hoffman N., Eicholtz D., Rogers S., Fraley R. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. - 1985. - 277. - P. 1299-1231.
9. Potrycus I., Shillito R., Saul M., Paszkowski J. Direct gene transfer. State of the art and future potential // Plant Molecular Biology Reporter. - 1985. - 3, N 3. - P. 117-128.
10. An G. High-efficiency transformation of cultured tobacco cells // Plant Physiol. - 1985. - 79, N 6. - P. 568-570.
11. Мельников П.В., Пастернак Т.П., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Микроинъекции ДНК в клетки высших растений // Докл. АН УССР. - 1985. - № 10. - С. 69-71.
12. Пастернак Т.П., Мельников П.В., Глеба Ю.Ю. и др. Генетическая трансформация клеток высших растений с помощью микроинъекций ДНК // Изв. АН СССР. - 1986. - № 2. - С. 314-316.

13. Crossways A., Oakes J.V., Irvine J.M. et al. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts // Mol. Gen. Genet. - 1986. - 202, N 2. - P. 179-185.
14. Neuchaus G., Spandenberg G., Mittelstein O., Schweiger H.-G. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids // TAG. - 1987. - 22, N 1. - P. 30-36.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Слияние растительных протопластов, механическая изоляция и культивирование единичных гетерокариоцитов	4
Методы генетической трансформации растений. "Кокультивиро- вание". "Листовые диски". "Прямой перенос генов"	10
Генетическая трансформация с помощью микроинъекции	16
Список литературы	20

Василий Павлович Момот
Николай Викторович Кучук
Тарас Петрович Пастернак

МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

Препринт

Утверждено к печати Ученым советом
Института ботаники им. Н.Г.Холодного
АН УССР

Подп. к печ. 31.08.88 Формат 60x84/16 Бумага офс. печ. офс.

Усл. печ. л. 1,39 Уч.-изд. л. 1 Тираж 300.

Зак. 8-838 Цена 25 коп.

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Релина, 4