

Разработка технологии межвидового переноса генов при селекции растений с помощью CRISPR/Cas системы

Кузьминых Денис Сергеевич
9 класс, МБОУ «Гимназия №136»

Научный руководитель: Тарасов Сергей Сергеевич, педагог ДО ГБУ ДО ЦМИНК «Кванториум»; старший преподаватель кафедры ботаники, физиологии и защиты растений ФГБОУ ВО Нижегородская ГСХА

*Работа посвящена изучению реакции ферментативной антиоксидантной системы овсяницы (*Festuca pratensis*) и кукурузы (*Zea mays*) в ответ на низкотемпературные воздействия, а также разработке инструмента редактирования генов антиоксидантной защиты для увеличения их устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли в прорастающих семенах и проростках с помощью нитросинего тетразолия. Активность каталазы (КАТ) в прорастающих семенах определяли газометрически, а в проростках спектрофотометрически. Общий белок определяли методом Лоури. Биоинформатический анализ проводили с использованием программ и баз данных. Показано подавление активности СОД и КАТ, как в прорастающих семенах, так и в проростках кукурузы после низкотемпературного воздействия. Зафиксировано увеличение активности исследуемых ферментов в прорастающих семенах и проростках овсяницы после низкотемпературного воздействия. Разработана система редактирования генов антиоксидантной защиты кукурузы путём их замены на гены овсяницы.*

В настоящее время учёные активно разрабатывают биологические способы борьбы с пагубным влиянием, например, холода на полезные сельскохозяйственных культуры. Одним из наиболее прорывных можно считать способ геномного редактирования (Кулуев, 2017). Самый распространенный способ геномного редактирования — CRISPR/Cas9 система, позволяющая разрезать ключевые гены патогенов, внося множественные генные летальные разрывы. Однако существует проблема, ограничивающая применение, заключающаяся в доставке sgRNA-Cas нуклеазы до генов патогенов (Marraffini, 2015). Другим важным направлением современного сельского хозяйства, повышающее эффективность растениеводства, является получение новых сортов, устойчивых к негативному воздействию окружающей среды. Одними из самых распространённых негативных факторов считается гипертермия, гипотермия и засуха. Жизненно важными генами можно назвать гены антиоксидантной защиты, в особенности, кодирующие супероксиддисмутазу (SOD) и каталазу (CAT) (Gill, 2010). Воздействуя на них с одной стороны, можно уничтожить вредный биообъект, а с другой, напротив – повысить его устойчивость. На основании изложенного целью нашей работы явилось выявить реакцию прорастающих семян и проростков кукурузы и овсяницы на кратковременное действие отрицательными температурами, а также создать вектор доставки CRISPR/Cas системы на основе аденовируса для замены гена CAT-1 кукурузы на таковой овсяницы.

Исследование проводили на суточных и недельных прорастающих семенах. Низкотемпературное воздействие проводили в морозильной камере в течении трех минут ($t = -20^{\circ}\text{C}$). По окончании экспозиции определяли общий белок методом Лоури (Lowry, 1951), активность СОД с использованием нитросинего тетразолия (НСТ) (Полесская и др., 2004), каталазу в семенах определяли газометрически (Ермаков, 1987), а в проростках спектрофотометрически (Patterson, 1984). Эксперимент проводился в трех биологических и трех биохимических повторностях. Результаты обработаны статистически, с расчётом среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (σ) с использованием программы Microsoft Excel 2010 (Гланц, 1999).

Для разработки инструмента редактирования генов работали с нуклеотидными последовательностями растений в <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore> и <https://phytozome.jgi.doe.gov/>, вирусов в <https://www.genome.jp/virushostdb/>, CRISPR кассет в <https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>. Генно-инженерные модификации проводили в программах SnapGene и Ugene. В качестве вектора использовали геном аденовируса.

В результате эксперимента установлено, что максимальная активность исследуемых ферментов наблюдалась в люцерне и овсянице, у кукурузы и гороха она была значительно ниже. Низкотемпературное воздействие, как на семена, так и на проростки овсяницы активировало работу СОД и КАТ ($P \leq 0,05$). Активность исследуемых ферментов в семенах и побегах кукурузы после гипотермического воздействия либо возрастала, либо не отличалась от контроля. Показано существенное, статистически значимое ($P \leq 0,05$) подавление активности СОД и КАТ во всех исследуемых частях полевицы и кукурузы у образцов на которые воздействовали отрицательными температурами (рис. 1 и 2).

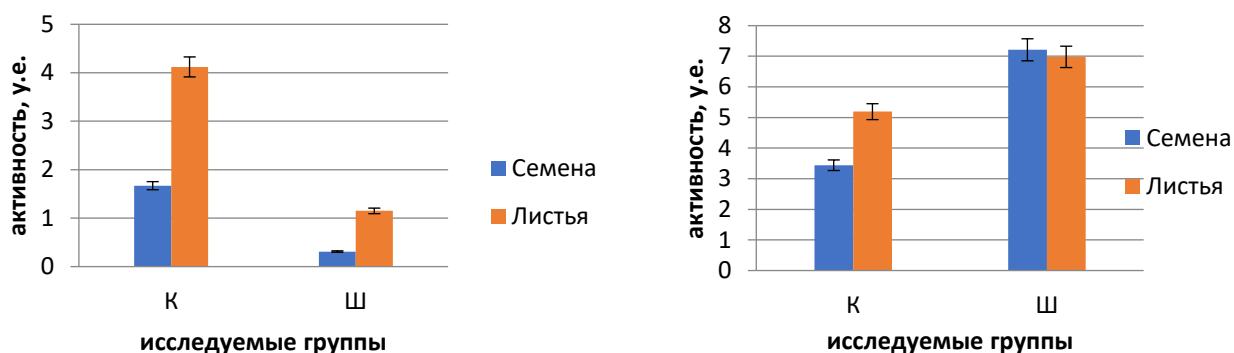


Рис. 1. Влияние гипотермии на активность СОД в прорастающих семенах и проростках кукурузы (слева) и овсяницы (справа), где К – контроль, Ш – семена подверженные низкотемпературному воздействию.

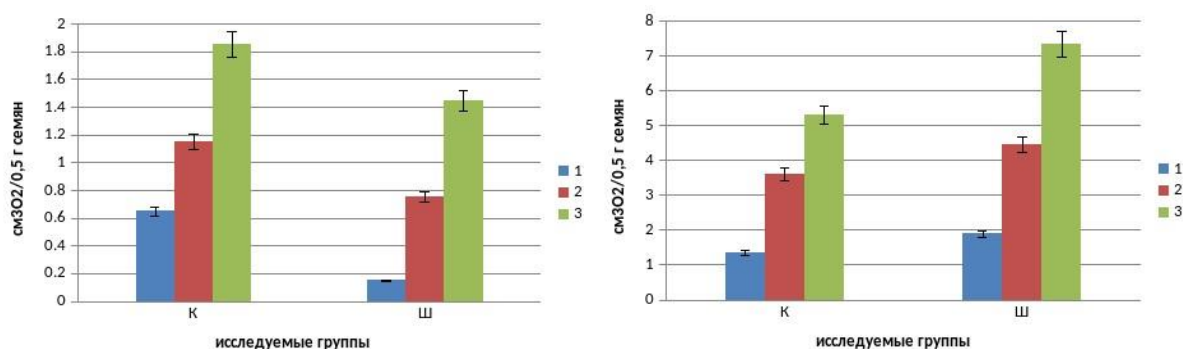


Рис. 2. Влияние гипотермии на активность КАТ в прорастающих семенах кукурузы (слева) и овсяницы (справа), где К – контроль, Ш – семена подверженные низкотемпературному воздействию.

Разрабатываемая нами модель представлена в виде генно-инженерного модифицированного аденовируса, 2 гена рецепции, которые подлежат замене на гены рецептора вируса кукурузы для его успешного проникновения в клетки данного растения.

Для успешной трансплантации гена предлагается создание 2-х модифицированных вирусов. Первый несет в себе донорный ген, а второй систему геномного редактирования с помощью, которой будет, происходить сама процедура замены в клетках кукурузы.

Для успешного редактирования предлагается следующая структура CRISPR вставки в геном аденовируса: две crRNA для рестрикции гена каталазы из генома кукурузы с помощью Cas 12 нуклеазы; две crRNA для рестрикции гена каталазы овсяницы из генома AV-1 с помощью Cas 12 нуклеазы; одна crRNA для тотальной рестрикции гена CAT кукурузы с помощью Cas 9 нуклеазы; ген tracrRNA; ген Cas 12 нуклеазы; ген Cas 9 нуклеазы.

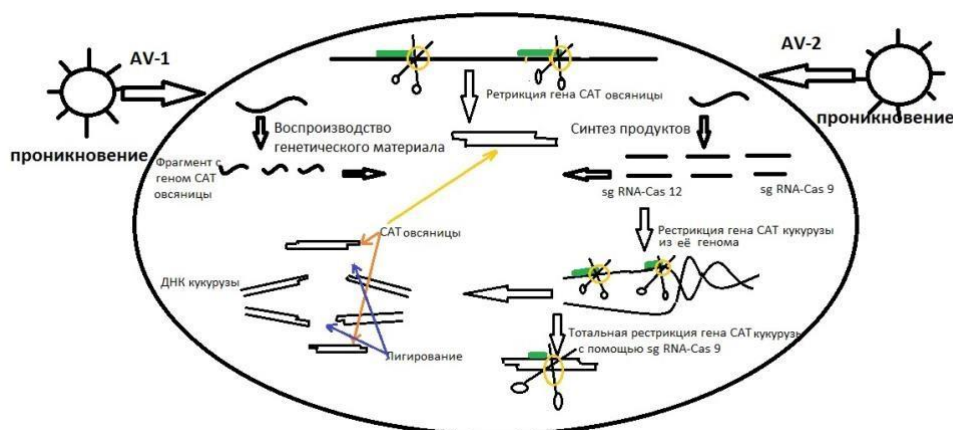


Рис. 3. Схема трансплантации гена CAT овсяницы в геном кукурузы, где AV-1 – вектор доставки гена CAT овсяницы; AV-2 – вектор доставки CRISPR/Cas 12 и CRISPR/Cas 9 систем.

На рис. 3 показан процесс трансплантации исследуемого гена. Генно-инженерные векторы на основе аденовируса проникают в клетки кукурузы, при этом AV-1 проникает раньше, чем AV-2. AV-1 несет в себе ген CAT-1 овсяницы, его репликация по сути увеличивает количество копий данного гена. Далее клетки кукурузы подвергаются трансформации AV-2, который несёт в себе гены CRISPR/Cas 12 и CRISPR/Cas 9 систем, помощью которых происходит вырезание гена CAT-1 овсяницы из генома AV-1, вырезание гена CAT-1 из генома кукурузы и его полная рестрикция, что не позволит пройти повторной вставке гена CAT-1 кукурузы. В связи с большим количеством копий гена CAT-1 овсяницы, у которого имеются «липкие» концы комплементарные месту вырезания гена CAT-1 кукурузы, велика вероятность его встраивания в данную область с последующим лигированием в состав генома кукурузы.

Выводы

1. Во всех исследуемых образцах овсяницы активность супероксиддисмутазы и каталазы выше, чем в образцах кукурузы. Гипотермическое воздействие подавляет активность данных ферментов в семенах и проростках гороха, но усиливает во всех исследуемых группах овсяницы. Из этого следует, что овсяница лучше приспособлена к низкотемпературному воздействию по сравнению с кукурузой.
2. Разработана модель на основе 2х аденовирусов. 1я включает в себя рецепторы вируса кукурузы и ген кодирующий CAT, а 2й, в свою очередь включает в себя рецепторы вируса кукурузы и CRISPR/CAS систему.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика. 1999. – 459 с
2. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений // Л.: Агропромиздат. - 1987 - С. 41-45.
3. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матиязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. // CRISPR/Cas редактирование геномов растений. Биомика. 2017. Том 9. №3 С. 155-182
4. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 686-691.
5. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem. 2010 Dec;48(12):909-30. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20870416.
6. Lowry O. , Rosebrough N. , Farr A. , Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. // J.Biol.Chem. 1951. 193, 265-270. J.Biol.Chem. 1951

7. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):55-61. doi: 10.1038/nature15386. PMID: 26432244
8. Patterson B. D., Paune L. A., Chen Yi-Zhu, Graham P. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants// *Plant Physiology*, 1984. Vol .76, №4 P. 1014-1018.