

УДК 602.627

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ БИОБАЛЛИСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ *Nicotiana tabacum*

© 2023 г. А. А. Давлекамова¹, А. В. Зубрицкий¹, Т. А. Тимофеева^{1, *},
И. В. Яковлева¹, А. М. Камионская¹

¹Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: timofeeva.bio@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 09.01.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Биобаллистическая трансформация — один из рабочих методов доставки нуклеиновых кислот в растительные клетки. В статье был проведен подбор параметров для работы с генной пушкой “PDS-1000/He Hepta System”. В качестве объекта исследований использовали модельное растение *Nicotiana tabacum*. Маркерным геном служил ген GFP (Green Fluorescent Protein). Были определены оптимальные параметры для трансформации клеток листьев *N. tabacum*: давление разрыва мембраны 1350 psi; размер частиц вольфрама 1.3 мкм; метод очистки плазмидной ДНК — переосаждение этанолом. Полученные результаты будут полезны для разработки протоколов биобаллистической трансформации растительных клеток, включая применение для редактирования генома сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: биобаллистика, *Nicotiana tabacum*, трансформация, GFP, PDS-1000/He

DOI: 10.31857/S0555109923030054, **EDN:** AZNGOK

Постоянный рост населения планеты и растущая потребность человечества в доступных и качественных продуктах питания, наряду с проблемой нехватки плодородных земель и увеличивающегося антропогенного воздействия на окружающую среду, требуют создания новых сельскохозяйственных растений с улучшенной продуктивностью и повышенной стрессоустойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды. Геномное редактирование открывает новые возможности перед учеными как для изучения генома, функций отдельных генов, а также для получения растений с заданными свойствами.

Биобаллистика или бомбардировка частицами — распространенный метод доставки ДНК непосредственно в растительные клетки, основанный на придании ускорения микрочастицам вольфрама или золота, несущими ДНК, за счет различных способов, включая сжатый гелий [1, 2]. Биобаллистическая трансформация имеет множество преимуществ, таких как простота, возможность совместной трансформации несколькими плазмидами и доставка больших фрагментов ДНК, и успешно используется для редактирования генома сельскохозяйственных культур, особенно слабовосприимчивых к трансформации с помощью *Agrobacterium*.

Система Bio-Rad PDS-1000/He (Bio-Rad, США) использует гелиевый импульс высокого давления для бомбардировки клеток микроносителями с ДНК-покрытием. Однако пневматический выстрел высокого давления может нести за собой негативные эффекты для хрупких тканей растений. Поэтому параметры применения Bio-Rad PDS-1000/He следует адаптировать в соответствии с конкретными целями.

Цель работы — оптимизация протокола трансформации модельного растения табака *Nicotiana tabacum* методом биобаллистики с помощью генной пушки PDS-1000.

МЕТОДИКА

Установка для биобаллистики. Для проведения биобаллистической трансформации эксплантов *N. tabacum* использовали генную пушку “PDS-1000/He Hepta System”, 450–2200 кПА (“Bio-Rad”, США) [3–5].

Плазмидная ДНК. В работе использовали плазмиду pHBT95::sGFP(S65T)-NOS [6], которая была любезно предоставлена Лабораторией стрессоустойчивости растений ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Россия).

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit ("Thermo Scientific", Литва) в соответствии с указанным в инструкции производителя протоколом. После выделения на спин-колонках плазмиды пересаживали 80%-ным этанолом или ПЭГ/MgCl₂ (10% PEG 6000: MgCl₂ 10 mM) [7].

Растительный материал. Растения табака *N. tabacum* выращивали в климатической камере *in vitro*. Для этого семена табака стерилизовали промыванием в 75%-ном этаноле, далее выдерживали в 2%-ном растворе гипохлорита натрия в течение 3 мин и троекратно промывали стерильной дистиллированной водой. Семена проращивали в чашках Петри в стерильных условиях на агаризованной среде Мурасиге—Скуга (МС). После прорастания растения переносили в индивидуальные контейнеры с агаризованной средой МС и выращивали в течение 6 недель в климатической камере при температуре воздуха 21°C с 16-часовым фото-периодом.

Для проведения каждого эксперимента использовали растения 6-недельного возраста, от каждого растения отбирали как молодые, так и старые листья. Перед биобаллистической обработкой контейнеры открывали в ламинарном боксе и скальпелем отрезали выбранные листья в стерильных условиях. Экспланты помещали на чашки Петри с агаризованной средой МС и переносили к месту проведения эксперимента.

Биобаллистическая трансформация. Подготовку микрочастиц для биобаллистики, подготовку оборудования к обстрелу и нанесение ДНК на микрочастицы осуществляли как описано в технической документации производителя (PDS-1000/He Biolistic Delivery System, Instruction Manual), составленной по данным исследований Сэнфорда и Гордона—Камма [8, 9], и с учетом поставленной в исследовании задачи.

Навеску микрочастиц массой 30 мг помещали в пробирку объемом 1.5 мл и после добавления 1 мл 70%-ного этанола интенсивно перемешивали в течение 3–5 мин с использованием мини-центрифуги вортекс при скорости 2800 g (BioSan Combi-Spin FVL-2400n, Латвия), затем отстаивали 15 мин для осаждения и удаляли супернатант после центрифугирования (в течение 5 с на вортексе). Осажденные частицы трижды промывали стерильной дистиллированной водой (объемом по 1.0 мл), каждый раз перемешивая и отстаивая в течение 1 мин. Осажденные частицы суспендировали в 500 мкл стерильного 50%-ного глицерина, а затем распределяли в пробирки (объемом 1.5 мл) по 50 мкл суспензии частиц, обеспечивая их равномерное распределение за счет периодического вортексирования.

Основная задача подготовки оборудования к работе состояла в обеспечении стерильности всех

деталей генной пушки. Стерилизацию экрана, останавливающего мембраны при выстреле (Stopping screen), а также ряда деталей, в частности: держателя прорывающейся мембраны (Rapture Disk Retaining Cap); держателя макроносителей, на который нанесены микрочастицы для стрельбы (Macrocarrier holder), вместе с помещенными в него макроносителями, — осуществляли автоклавированием обернутых в фольгу деталей. Полочку для установки образца и камеру для стрельбы стерилизовали 70% этанолом, а прорывающую мембрану — быстрым погружением в 70%-ный изопропанол непосредственно перед установкой в генную пушку.

Для одного семизарядного выстрела наносили выделенную плазмидную ДНК на подготовленные микрочастицы следующим образом. К суспензии микрочастиц (50 мкл) добавляли 5 мкл ДНК (в концентрации 1.0 мкг/мкл), 50 мкл CaCl₂ (2.5 M), перемешивали 2–3 мин, отстаивали при комнатной температуре (1 мин) и центрифугировали (2 с). Полученные микрочастицы затем последовательно обрабатывали 70%-ным суперчистым этанолом (140 мкл) и после центрифугирования отбирали супернатант, который обрабатывали 100%-ным суперчистым этанолом (140 мкл), центрифугировали и отбирали супернатант. Полученные микрочастицы с осажденной на них ДНК ресуспендировали в 100%-ном этаноле (48 мкл) и наносили на мембраны макроносителей, помещенные в держатель. Держатель на стерильной фильтровальной бумаге предварительно помещали на абсолютно сухой CaCl₂ для обеспечения высыхания суспензии после нанесения. На каждый макроноситель наносили по 6 мкл подготовленных микрочастиц, с нанесенной на них плазмидной ДНК, и распределяли по площади 1 см² в центре макроносителя. Пипетирование проводили максимально быстро, чтобы не допустить осаждения микрочастиц. Процесс нанесения частиц проводили в ламинарном боксе для обеспечения стерильности.

Во всех экспериментах концентрация плазмидной ДНК составляла 1000 нг/мкл, расстояние от мембран с микрочастицами до растительного материала 9 см. В работе использовались микрочастицы вольфрама следующих размеров: 0.7, 1.1, 1.3, 1.7 мкм. В экспериментах по изучению влияния величины давления и метода очистки плазмидной ДНК в качестве носителя использовались вольфрамовые частицы диаметром 1.3 мкм.

Микроскопирование образца проводилось через 4 дня после обстрела с помощью Leica MZ FL III Fluorescence Stereo Microscope ("Leica Microsystems", Германия) под наборами фильтров GFP Plant — возбуждение флуоресценции длиной волны 470, наблюдение в диапазоне 40 нм, и GFP2 — возбуждение флуоресценции длиной волны 425, наблюдение в диапазоне 60 нм.

Таблица 1. Количество успешно трансформированных клеток в образцах эксперимента по изучению влияния величины давления на эффективность трансформации

Варианты опыта	Величина давления, psi		
	1350	1100	1350 (контроль)
Одиночные успешно трансформированные клетки, шт	48	18	0
Скопления успешно трансформированных клеток, шт	3	0	0

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние величины давления на эффективность трансформации. Плазмидная ДНК несущая ген, кодирующий GFP, была предварительно очищена методом переосаждения этанолом. В эксперименте использовали два варианта величины давления гелия на разрывную мембрану: 1350 и 1100 psi, контрольный вариант опыта (стрельба “пустыми” микрочастицами, без плазмидной ДНК) проводился при давлении 1350 psi.

Чтобы сравнить результаты стрельбы, мы сделали по 10 снимков каждого образца на увеличении $\times 5$ и посчитали количество трансформированных клеток, попавших в поле зрения.

В результате трансформации листовых эксплантов *N. tabacum* на третий день наблюдали наибольшее количество трансформированных клеток в варианте с давлением 1350 psi. Исходя из полученных результатов (табл. 1, рис. 1), давление 1350 psi было наиболее подходящим для трансформации эксплантов *N. tabacum* с использованием Bio-Rad PDS-1000/He, хотя давление 1550 psi также приводило к удовлетворительным результатам.

Влияние давления и метода очистки на эффективность трансформации. Экспланты *N. tabacum* подвергали бомбардировке при 1350 и 1550 psi частицами, покрытыми ДНК, очищенной с использо-

ванием переосаждения этанолом или PEG/MgCl₂ и переосаждения этанолом (табл. 2, рис. 3).

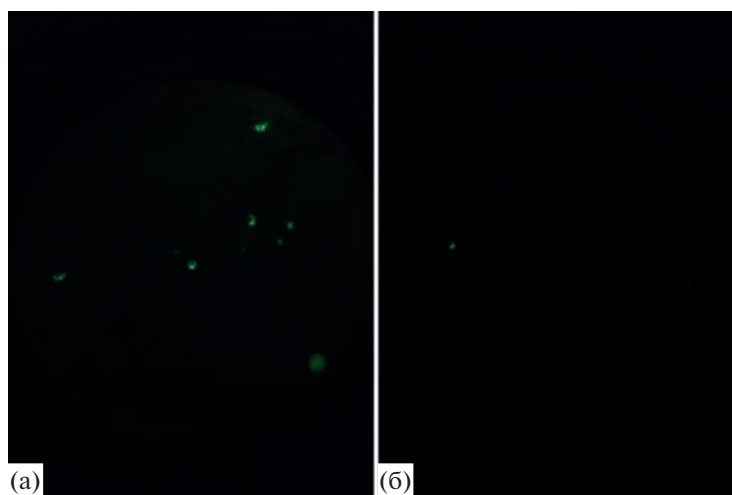
Результаты показали, что использование ДНК, очищенной переосаждением этанолом, дает большее количество успешно трансформированных клеток по сравнению с PEG/MgCl₂ с последующим переосаждением этанолом.

Эффективность трансформации в зависимости от размера частиц. Далее исследовали влияние размера микрочастиц (вольфрама) на трансформацию эксплантов *N. tabacum* с использованием давления 1350 psi и повторного осаждения ДНК этанолом, а также с использованием микрочастиц вольфрама следующих размеров: 0.7, 1.1, 1.3, 1.7 мкм.

Результаты показали, что оптимальный размер микрочастиц вольфрама для трансформации *N. tabacum* составлял 1.3 мкм (табл. 3, рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Опубликовано значительное количество работ, описывающих отработку протокола биобаллистической трансформации для различных видов растений [3–5]. Большинство экспериментов было проведено с использованием генной пушки PDS-1000, Bio-Rad. Можно привести пример ра-

**Рис. 1.** Изображение успешно трансформированных клеток *N. tabacum* с транзиторной экспрессией гена GFP, pHBT95::sGFP(S65T)-NOS, фильтр GFP Plant, давление 1350 (а), 1100 psi (б). Увеличение $\times 5$.

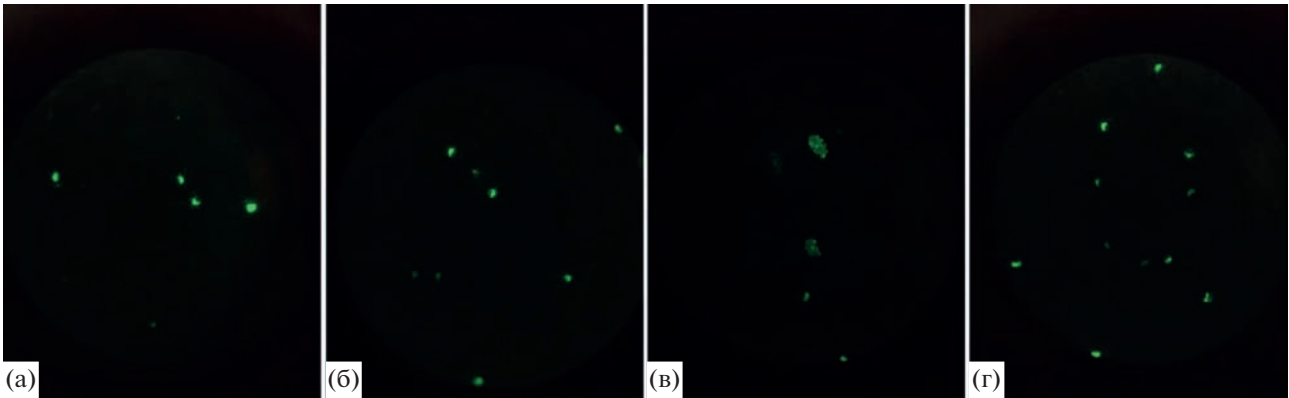


Рис. 2. Изображение успешно трансформированных клеток *N. tabacum* с транзientной экспрессией гена GFP в эксперименте по определению оптимального давления выстрела, pHBT95::sGFP(S65T)-NOS, фильтр GFP Plant, давление 1350 psi, этанол (а), 1350 psi, PEG, MgCl₂ и этанол (б), 1550 psi, этанол (в), 1550 psi, PEG, MgCl₂ и этанол (г). Увеличение ×5.

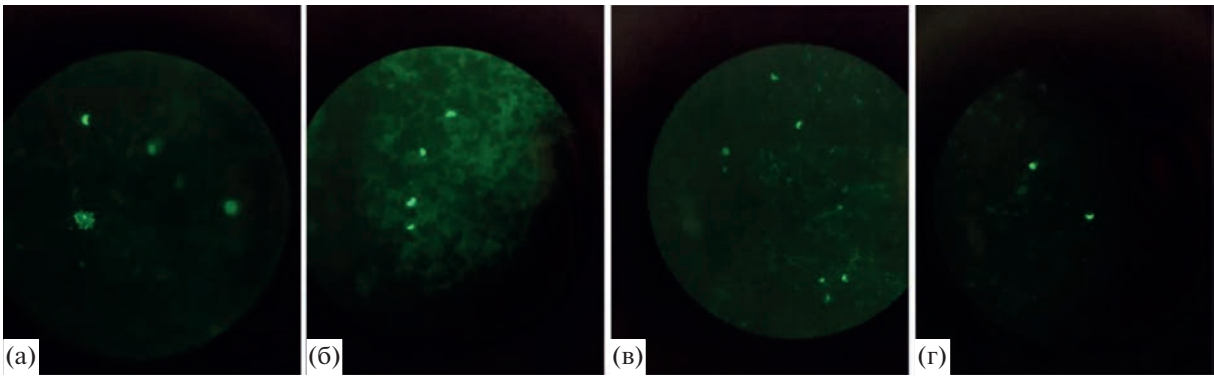


Рис. 3. Изображение успешно трансформированных клеток *N. tabacum* с транзientной экспрессией гена GFP в эксперименте по определению оптимального размера микрочастиц вольфрама, pHBT95::sGFP(S65T)-NOS, фильтр GFP Plant, размер частиц 0.7 (а), 1.1 (б), 1.3 (в), 1.7 мкм (г). Увеличение ×5.

боты, в которой в 1996 г. с помощью биобаллистического метода была трансформирована клеточная культура риса *Pusa basmati* для придания культуре устойчивости к гербициду. Кроме того, была использована система детекции успешности

трансформации GUS [3]. Обстрел производился при давлении 1500 psi микрочастицами размером около 1 мкм, а параметры, такие как материал частиц (золото и вольфрам), расстояние до поверхности эксплантов (9 и 12 см), менялись для подбора

Таблица 2. Количество успешно трансформированных клеток в образцах при изучении влияния давления и метода очистки на эффективность трансформации

Вариант	Способ очистки плазмидной ДНК				
	без очистки	пересаживание этанолом	PEG и MgCl ₂ , пересаживание этанолом	пересаживание этанолом	PEG и MgCl ₂ , пересаживание этанолом
Давление, psi	1350	1350		1550	
Одиночные успешно трансформированные клетки, шт	0	57	44	43	40
Скопления успешно трансформированных клеток, шт	0	3	2	1	0

Таблица 3. Количество успешно трансформированных клеток в образцах эксперимента при изучении эффективности трансформации в зависимости от размера частиц

Вариант опыта	Микрочастицы вольфрама, мкм			
	0.7	1.1	1.3	1.7
Одиночные успешно трансформированные клетки, шт	15	27	50	12
Скопления успешно трансформированных клеток, шт	2	0	1	1

оптимальных. В результате опытов оптимальным было признано использование золотых частиц, эффективность которых была в 2.5–5.4 раз больше, чем у вольфрамовых, и расстояние от макроносителей до трансформируемого образца – 9 см [3].

При величине давления, используемого в упомянутом исследовании (1550 psi), в настоящей работе также были получены неплохие результаты, однако для растения *N. tabacum* оптимальным оказалось давление 1350 psi. В исследовании было также выбрано расстояние до эксплантов 9 см, так как при меньшем расстоянии микрочастицы не распределялись равномерно по обстреливаемой площади. Оптимальный размер частиц для трансформации *N. tabacum* оказался больше, чем для риса *P. basmati*.

В более позднем исследовании эмбрионы пшеницы *Triticum aestivum* L. трансформировали системами, содержащими кодирующие репортерные гены GUS и GFP. Были испытаны частицы золота размером 0.4–1.2 мкм и давление в установке 450, 650, 950 и 1100 psi, обстрел производился на расстоянии 9 см. Давления 650 и 950 psi представлялись исследователями как оптимальные для трансформации незрелых зародышей пшеницы. Оптимальный размер частиц золота составлял 0.6 мкм [4].

При исследовании биобаллистической трансформации *Triticum aestivum* [5] авторы определяли, какой метод нанесения ДНК на микрочастицы более эффективен – PEG/Mg²⁺ или Spd/Ca²⁺ (с использованием спермидина). Обработка также проводилась золотыми частицами размером 0.6 микрона с расстояния 6 см при давлении 900 psi. Использование PEG/Mg²⁺ было более эффективным, но результаты трансформации с помощью Spd/Ca²⁺ сильно различались в зависимости от количества спермидина.

В одной из последних работ изучалась трансформация перца *Capsicum frutescens* L. плазмидой с системой детекции, основанной на экспрессии белка GFP (Green Fluorescent Protein). Бомбардировку проводили микрочастицами золота 0.6, 1.0 и 1.6 мкм на расстоянии 3, 6 и 9 см от макроносителей до эксплантов при 900, 1100 и 1350 psi. По результатам исследований оптимальное сочетание параметров было установлено для стрельбы с

расстояния 6 см частицами размером 1.6 мкм при давлении 1350 psi [10].

В отличие от исследований оптимальных параметров протокола биобаллистической трансформации для различных растений, которые были проведены ранее, в настоящем исследовании для доставки генетического материала в клетку использовались только вольфрамовые микрочастицы. В связи с трудностями доставки золотых частиц, вольфрамовые микрочастицы оказались более доступными и экономически выгодными носителями плазмидной ДНК для трансформирования растений.

Также в работе использовалась система детекции на основе временной экспрессии белка GFP с плазмидой pHBT95::sGFP(S65T)-NOS. Использование этой конструкции позволило фиксировать результаты трансформации через 4 дня после проведения обработки без необходимости извлекать растение из стерильных условий. Такой подход ускоряет работу с трансформированными эксплантатами и анализ результатов, а, кроме того, позволяет проводить обстрел целых растений в условиях *in vitro*, предотвращая их гибель и позволяя проводить дальнейшие наблюдения за их развитием.

Биобаллистическая трансформация растений – перспективное направление генной инженерии, значительно расширяющее возможности исследований, т. к. позволяет трансформировать растения, не поддающиеся классической агробактериальной трансформации.

Экспериментально подтверждено, что оптимальные параметры биобаллистической трансформации на установке “PDS-1000/He Hepta System” для модельного растения *N. tabacum* следующие: давление – 1350 psi, расстояние от макроносителей до образца – 9 см, размер вольфрамовых микрочастиц – 1.3 мкм, очистка после выделения на спин-колонках – переосаждение этанолом.

Полученные результаты будут использованы для дальнейшей отработки методики биобаллистической трансформации модельного растения *N. tabacum*, а также других видов растений. В дальнейшем планируется проведение экспериментов по

расширению перечня носителей и трансформированных видов растений, особенно, культур сельскохозяйственного значения, что позволит реализовать разработанный протокол в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Авторы выражают благодарность Лаборатории стрессоустойчивости растений ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии (Россия) за предоставленную плазмиду pHBT95::sGFP(S65T)-NOS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanford J.C. // Trends Biotechnol. 1988. V. 6. P. 299–302.
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(88\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(88)90023-6)
2. Hansen G., Wright M.S. // Trends Plant Sci. 1999. V. 4. P. 226–231.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01412-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01412-0)
3. Jain R.K., Jain S., Wang B., Wu R. // Plant Cell Rep. 1996. V. 15. № 12. P. 963–968.
<https://doi.org/10.1007/BF00231597>
4. Sparks C.A., Jones H.D. // Meth. in Mol. Biol. 2009. V. 478. P. 71–92.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_4
5. Ismagul A., Yang N., Maltseva E., Iskakova G. // Plant Biol. 2018 V. 18. P. 135–143.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1326-1>
6. Zhang J., Du H., Chao M., Yin Z., Yang H., Li Y., Huang F., Yu D. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 628.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00628>
7. Аукенов Н.Е., Масабеева М.Р., Хасанова У.У. // Наука и Здравоохранение. 2014. № 1. С. 51–53.
8. Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R. // The Plant Cell. 1990. V. 2. P. 603–618.
<https://doi.org/10.1105/tpc.2.7.603>
9. Sanford J.C., Smith F.D., Russell J.A. Meth. in Enzymol. 1993. V. 217. P. 483–509.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17086-K](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17086-K)
10. Chee M.J.Y., Lycett G.W., Chin C.F. // Electronic J. Biotechnol. 2018. V. 34. 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.05.005>

Optimization of Biolistic Transformation Parameters for *Nicotiana tabacum*

A. A. Davlekaeva^a, A. V. Zubritsky^a, T. A. Timofeeva^a, *, I. V. Yakovleva^a, and A. M. Kamionskaya^a

^a Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: timofeeva.bio@gmail.com

Biolistics is one of the widely used methods to deliver nucleic acids into plant cells. In this work, we optimized the protocol for biolistic transformation of *Nicotiana tabacum* with the gene gun PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System. The Green Fluorescent Protein (GFP) gene was used as a marker. The optimal parameters for the transformation of *N. tabacum* leaf cells were determined as: pressure, 1350 psi; tungsten particle size, 1.3 µm; plasmid DNA purification method, ethanol re-precipitation. The results should be useful for the development of biolistic transformation protocols for plant cells, including application for plant genome editing of agricultural species.

Keywords: Biolistic transformation, *Nicotiana tabacum*, GFP, Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System