

Поиск модельных генов для VIGS и подбор универсальных праймеров на сплайс-варианты мРНК к *Arabidopsis thaliana*

Научный руководитель – Голубева Татьяна Сергеевна

Урин Амель Витальевич

Студент (бакалавр)

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

E-mail: avel55793@gmail.com

РНК-интерференция является весьма перспективным инструментом регуляции экспрессии генов. Одной из основных сфер ее применения является сельское хозяйство, где на основе искусственно синтезированных олигонуклеотидов разрабатываются высокоизбирательные инсектициды и гербициды, а также повышается устойчивость культурных растений к вирусным и грибным патогенам. У растений хорошие результаты показал вирус-индуцированный генный сайленсинг (VIGS), который использует векторную конструкцию на основе вируса табачной мозаики для доставки целевой последовательности, необходимой для наработки дцРНК. Наиболее распространенным геном-мишенью в таких исследованиях выступает ген фитоендесапуразы, сайленсинг которого имеет четкое фенотипическое проявление в виде побеления листьев. К сожалению, данный фенотип развивается лишь через 4-5 недель после обработки растений, поэтому поиск новых генов, дающих более быстрый видимый эффект, является весьма актуальной задачей.

Для поиска новых кандидатов было решено использовать гены, кодирующие ферменты, так как их выключение будет иметь более быстрое фенотипическое проявление, нежели сайленсинг генов структурных белков. В качестве модельного объекта выбран арабидопсис *Arabidopsis thaliana* как одно из наиболее изученных растений. После подробного анализа литературных данных были выбраны следующие ферменты: липоксигеназа 2 (LOX2), бета-карбоангидраза 5 (bCA5), гамма-1 и гамма-2 карбоангидразы (gamma CA1, gamma CA2), так как мутанты по этим генам соответствующих ферментов имеют хорошо диагностируемые фенотипические отличия от растений дикого типа.

На начальном этапе работы необходимо подобрать праймеры для наработки соответствующих фрагментов кДНК. Ситуация осложняется тем, что все выбранные гены, кроме gamma CA2, имеют несколько сплайс-вариантов, кодирующих одинаковую аминокислотную последовательность, но имеющих разные 3'-UTR и 5'-UTR зоны. Для решения этой проблемы последовательности генов были выровнены через программу MUSCLE. После этого соответствующие праймеры были подобраны с использованием программы Primer-BLAST только на участки, совпадающие у каждого сплайс-варианта для этого гена. Проверка каждой пары праймеров на возникновение селф- и гетеродимеров была дополнительно выполнена через ресурс OligoAnalyzer. В завершение к 5'-концам каждого праймера была добавлена последовательность специфичного сайта рестрикции с использованием программы SnapGene. Используя это же программное обеспечение, было проведено моделирование ПЦР реакции и клонирования в вектор.

В дальнейшем планируется наработка соответствующих фрагментов кДНК с целью их клонирования в вектор, его трансфекции в агробактерии с последующей инокуляцией в растения.