

**Синтез олигонуклеотидов *in vivo* для регуляции работы гена  
фитоендесатуразы *Nicotiana benthamiana***

**Научный руководитель – Голубева Татьяна Сергеевна**

**Черенко Виктория Александровна**

*Студент (магистр)*

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,  
Новосибирск, Россия

*E-mail: v.cherenko@g.nsu.ru*

Олигонуклеотидные последовательности являются достаточно молодым и перспективным направлением в молекулярной биологии, биотехнологии, диагностике и терапии различных заболеваний, а разнообразные химические модификации олигонуклеотидов постоянно расширяют спектр для их возможного применения. Например, в сельском хозяйстве олигонуклеотиды могут использоваться в качестве селективных препаратов для защиты растений, в основе механизма которой лежит РНК-интерференция. Такой подход позволяет избирательно регулировать активность генов без создания ГМО.

Для защиты растений в настоящее время применяются дцРНК, синтезированные как *in vivo*, так и *in vitro* [1]. Молекулы дцРНК проникают в растительный протопласт после непосредственного нанесения на листья растений путем распыления, механической инокуляции, загрузки на глиняные наночастицы, использования материалов, способствующих адгезии РНК или втирания в листья [2]. Синтез необходимых последовательностей *in vitro* достаточно быстрый и удобный, но весьма затратный, особенно при создании последовательностей оптимальной длины. Кроме того, он мало пригоден для крупномасштабного производства. Для синтеза олигонуклеотидов в бактериях (*in vivo*) необходимо создавать генно-инженерные конструкции, но этот подход более перспективен для масштабирования.

В нашей работе мы разработали методику для синтеза дцРНК *in vivo* с целью регуляции работы гена фитоендесатуразы табака *Nicotiana benthamiana* - этот фермент часто используется в качестве модельного при разработке новых подходов в регуляции активности генов, так как сайленсинг данного гена имеет удобное фенотипическое проявление в виде побеления (фотообесцвечивания) молодых листьев.

В результате были получены клетки *E. coli* HT115, несущие плазмиду L4440 со встроенной последовательностью для сайленсинга фитоендесатуразы *N. benthamiana* с помощью РНК интерференции. Наличие встройки подтверждено секвенированием. Корневая обработка растений проводилась грубым лизатом бактериальной суспензии, полученным после обработки ультразвуком. Контрольные растения вместо лизата бактерий, нарабатывающих дцРНК, получали лизат *E. coli* HT115 без плазмиды, лизат *E. coli* HT115 с нативной плазмидой L4440, а также воду и буфер, в котором проводился лизис. Обработка растений проводилась 3 раза в неделю в течение 4 недель.

Спустя 4 недели обработки в экспериментальной группе растений *N. benthamiana* было обнаружено фотообесцвечивание листьев, характерное для сайленсинга фитоендесатуразы. Таким образом, нами показана возможность регуляции работы генов растения с помощью олигонуклеотидных последовательностей, синтезированных *in vivo*.

**Источники и литература**

- 1) 1. Dubrovina A. S., Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – № 9 (20)

- 2) L. Jiang., Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA / L. Jiang, L. Ding, B. He et al. // *Nanoscale*. – 2014. – № 17 (6). – P. 9965–9969.