

ISSN 2518-1629 (Online),
ISSN 2224-5308 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
С. Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Казахский национальный медицинский
университет им. С. Д. Асфендиярова

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
Asfendiyarov
Kazakh National Medical University

SERIES
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

6 (342)

NOVENBER – DECEMBER 2020

PUBLISHED SINCE JANUARY 1963

PUBLISHED 6 TIMES A YEAR

ALMATY, NAS RK

Бас редактор

НҮРҒОЖИН Талғат Сейітжанұлы, медицина ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА корреспондент мүшесі (Алматы, Қазақстан) Н = 10

РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:

БЕРСІМБАЕВ Рахметқажы Ескендірұлы (бас редактордың орынбасары), биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі (Алматы, Қазақстан) Н = 12

ЖАМБАКИН Қабыл Жапарұлы (бас редактордың орынбасары), биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі (Алматы, Қазақстан) Н = 2

БИСЕНБАЕВ Амангелді Қуанышбайұлы, биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі (Алматы, Қазақстан) Н = 7

ХОХМАНН Джудит, Сегед университетінің фармацевтика факультетінің фармакогнозия кафедрасының меңгерушісі, жаратылыстану ғылымдарының пәнаралық орталығының директоры (Сегед, Венгрия) Н = 38

РОСС Самир, PhD докторы, Миссисипи университетінің өсімдік өнімдерін ғылыми зерттеу ұлттық орталығы Фармация мектебінің профессоры (Оксфорд, АҚШ) Н = 35

ФАРУК Асана Дар, Хамдард Аль-Маджида шығыс медицина колледжінің профессоры, Хамдард университетінің Шығыс медицина факультеті (Карачи, Пәкістан) Н = 21

ТОЙШЫБЕКОВ Мәкен Молдабайұлы, ауыл шаруашылығы ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі (Алматы, Қазақстан) Н = 2

САҒИТОВ Абай Оразұлы, биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі (Алматы, Қазақстан) Н = 4

ХУТОРЯНСКИЙ Виталий, философия докторы (Ph.D, фармацевт), Реддинг университетінің профессоры (Реддинг, Англия) Н = 40

БЕНБЕРИН Валерий Васильевич, (бас редактордың орынбасары), медицина ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі, Қазақстан Республикасы Президенті Іс Басқармасы Медициналық орталығының директоры (Алматы, Қазақстан) Н = 11

ЛОКШИН Вячеслав Нотанович, ҚР ҰҒА академигі, медицина ғылымдарының докторы, профессор, "PERSONA" халықаралық клиникалық репродуктология орталығының директоры (Алматы, Қазақстан) Н = 8

СЕМЕНОВ Владимир Григорьевич, биология ғылымдарының докторы, профессор, Чуваш республикасының еңбек сіңірген ғылым қайраткері, морфология, Акушерлік және терапия кафедрасының меңгерушісі, "Чуваш мемлекеттік аграрлық университеті" Федералдық мемлекеттік бюджеттік жоғары білім беру мекемесі (Чебоксары, Чуваш Республикасы, Ресей) Н = 23

ЩЕПЕТКИН Игорь Александрович, медицина ғылымдарының докторы, Монтана штаты университетінің профессоры (АҚШ) Н = 27

«ҚР ҰҒА Хабарлары. Биология және медициналық сериясы».

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

Меншіктеуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» РҚБ (Алматы қ.).

Қазақстан Республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде 01.06.2006 ж. берілген №5546-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік.

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 300 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28; 219, 220 бөл.; тел.: 272-13-19

<http://biological-medical.kz/index.php/en/>

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2020

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Мұратбаев көш., 75.

Главный редактор:

НУРГОЖИН Талгат Сейтжанович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН РК (Алматы, Казахстан) Н = 10

Редакционная коллегия:

БЕРСИМБАЕВ Рахметкажи Искендерович (заместитель главного редактора), доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК (Алматы, Казахстан) Н = 12

ЖАМБАКИН Кабыл Жапарович (заместитель главного редактора), доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК (Алматы, Казахстан) Н = 2

БИСЕНБАЕВ Амангельды Куанбаевич (заместитель главного редактора), доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК (Алматы, Казахстан) Н = 7

ХОХМАНН Джудит, заведующий кафедрой Фармакогнозии Фармацевтического факультета Университета Сегеда, директор Междисциплинарного центра естественных наук (Сегед, Венгрия) Н = 38

РОСС Самир, доктор PhD, профессор Школы Фармации национального центра научных исследований растительных продуктов Университета Миссисипи (Оксфорд, США) Н = 35

ФАРУК Асана Дар, профессор колледжа Восточной медицины Хамдарда аль-Маджида, факультет Восточной медицины университета Хамдарда (Карачи, Пакистан) Н = 21

ТОЙШИБЕКОВ Макен Молдабаевич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик НАН РК (Алматы, Казахстан) Н = 2

САГИТОВ Абай Оразович, доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК (Алматы, Казахстан) Н = 4

ХУТОРЯНСКИЙ Виталий, доктор философии (Ph.D, фармацевт), профессор Университета Рединга (Рединг, Англия) Н = 40

БЕНБЕРИН Валерий Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, академик НАН РК, директор Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан (Алматы, Казахстан) Н = 11

ЛОКШИН Вячеслав Нотанович, академик НАН РК, доктор медицинских наук, профессор, директор Международного клинического центра репродуктологии «PERSONA» (Алматы, Казахстан) Н = 8

СЕМЕНОВ Владимир Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Чувашской Республики, заведующий кафедрой морфологии, акушерства и терапии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чувашский государственный аграрный университет» (Чебоксары, Чувашская Республика, Россия) Н = 23

ЩЕПЕТКИН Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор Университета штата Монтана (США) Н = 27

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская».

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы).

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год.

Тираж: 300 экземпляров.

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28; ком. 219, 220; тел. 272-13-19

www.nauka-nanrk.kz / biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2020
Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75.

Editor in chief:

NURGOZHIN Talgat Seitzhanovich, Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member of NAS RK (Almaty, Kazakhstan) H = 10

Editorial board:

BERSIMBAEV Rakhmetkazhi Iskendirovich (deputy editor-in-chief), Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of NAS RK, L.N. Gumilyov Eurasian National University (Nur-Sultan, Kazakhstan) H = 12

ZHAMBAKIN Kabyl Zhaparovich, Professor, Academician of the NAS RK, Director of the Institute of Plant Biology and Biotechnology (Almaty, Kazakhstan) H = 2

BISENBAEV Amangeldy Kuanbaevich (Deputy Editor-in-Chief), Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of NAS RK (Almaty, Kazakhstan) H = 7

HOHMANN Judith, Head of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Szeged, Director of the Interdisciplinary Center for Life Sciences (Szeged, Hungary) H = 38

ROSS Samir, Ph.D., Professor, School of Pharmacy, National Center for Scientific Research of Herbal Products, University of Mississippi (USA) H = 35

PHARUK Asana Dar, professor at Hamdard al-Majid College of Oriental Medicine. Faculty of Oriental Medicine, Hamdard University (Karachi, Pakistan) H = 21

TOISHIBEKOV Maken Moldabaevich, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of NAS RK (Almaty, Kazakhstan) H = 2

SAGITOV Abai Orazovich, Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of NAS RK (Almaty, Kazakhstan) H = 4

KHUTORYANSKY Vitaly, Ph.D., pharmacist, professor at the University of Reading (Reading, England) H = 40

BENBERIN Valery Vasilievich, Doctor of Medicine, Professor, Academician of NAS RK, Director of the Medical Center of the Presidential Property Management Department of the Republic of Kazakhstan (Almaty, Kazakhstan) H = 11

LOKSHIN Vyacheslav Notanovich, Professor, Academician of NAS RK, Director of the PERSONA International Clinical Center for Reproductology (Almaty, Kazakhstan) H = 8

SEMENOV Vladimir Grigorievich, Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Scientist of the Chuvash Republic, Head of the Department of Morphology, Obstetrics and Therapy, Chuvash State Agrarian University (Cheboksary, Chuvash Republic, Russia) H = 23

TSHEPETKIN Igor Aleksandrovich, Doctor of Medical Sciences, Professor at the University of Montana (Montana, USA) H = 27

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.
ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty).

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, is sued 01.06.2006.

Periodicity: 6 times a year.

Circulation: 300 copies.

Editorial address: 28, Shevchenko str. of. 219, 220, Almaty, 050010; tel. 272-13-19

<http://nauka-nanrk.kz> / biological-medical.kz

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2020

Address of printing house: ST «Aruna», 75, Muratbayev str, Almaty.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 342 (2020), 62 – 74

<https://doi.org/10.32014/2020.2519-1629.52>

УДК 576.3:581.1:633.11

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ГЕНА АНТИ-ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА FeSOD ДЛЯ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СОИ**

**О.И. Кершанская¹, М.А. Абдулжанова¹, М.М. Исмаилова¹,
С.К. Даулетбаева¹, А.А. Гулевич²**

¹РГП Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²Научно-Исследовательский Институт Сельскохозяйственной Биотехнологии РАСХН,
Москва, Россия

Аннотация. Генетическая инженерия ключевых метаболических путей, таких как фенилпропаноидный цикл, является мощным средством улучшения сельскохозяйственных культур на новом этапе биотехнологии в пост-Геномную эру. На сегодняшний день успехи в генетическом улучшении растений к действию стрессов связаны с манипуляцией одного или нескольких генов, вовлеченных в сигнальные/регуляторные пути, или кодирующие ферменты, вовлеченные в эти пути. Целью данного исследования является разработка этапов генетического конструирования на примере создания промоторной конструкции ключевого гена антиокислительного стресса FeSOD, кодирующего фермент Fe-зависимая супероксид дисмутаза, который придает растениям устойчивость к окислительному стрессу и неспецифическую устойчивость к различным видам абиотических и биотических стрессов, за счет запуска сигнальных путей, связанных с активными формами кислорода (ROS). Создание эффективных генетических конструкций целевого гена FeSOD осуществляли методами молекулярного клонирования генов, оптимизированными в ходе исследовательской работы. Основные результаты: изучены аминокислотная и нуклеотидная последовательности; клонированы сигнальные последовательности, созданы кассеты экспрессии, карты Т-области целевого гена FeSOD. Ген клонирован в растительную плазмиду pEXSOD10 и трансформирован в *Agrobacterium tumefaciens*, штамм EHA105. Подтверждено клонирование и идентификация данного гена методами ПЦР, рестрикции и секвенирования. Таким образом, создана генетическая конструкция гена FeSOD для трансформации растений.

Ключевые слова: генетическая инженерия, промоторная конструкция гена FeSOD, агробактериальная трансформация, молекулярная идентификация.

Введение. Болезни сои в Казахстане являются одной из серьезных проблем, снижающих ее урожайность до 15%, но изучены совершенно недостаточно. Широко распространены болезни, вызванные микротогенами и микрогрибами, такими как ложная мучнистая роса, возбудитель заболевания – микрогриб *Peronospora manshurica* (Naum.); бурая пятнистость листьев, возбудитель болезни – микрогриб *Phyllosticta sojaecola* Mass, *Phytophthora*, но меры борьбы с ними сводятся только к агротехническим мероприятиям. В мировом масштабе потери от болезней сои достигают 11-50% от валовой продукции. Устойчивость растений является экономическим и устойчивым средством управления болезнями. Попытки усилить природные защитные системы, такие как биосинтез лигнина методами генетической инженерии, могут помочь лимитировать колонизацию микротогенов [1, 2].

Многочисленные биотические и абиотические стрессовые факторы негативно влияют на различные аспекты роста, развития и продуктивности растений. Растение, как прикрепленный к

месту произрастания организм, в процессе эволюции развил эффективные стратегии избегания, толерантности и адаптации к различным типам стрессовых ситуаций [3]. Возможности новых ‘omics’ исследований, таких как геномикс, протеомикс и метаболомикс позволили исследователям определять генетику отношения растения к стрессу [4].

Трансгенный подход позволяет перейти от изучения механизмов устойчивости к стрессу к улучшению устойчивости растения [5-14]. На сегодня успех генетического улучшения устойчивости растений к стрессам включает манипуляции единичных или нескольких генов, вовлеченных в сигнальные/регуляторные пути, или генов, кодирующих ферменты важнейших метаболических циклов. Для генетической трансформации сои и других сельскохозяйственных культур необходимо создание эффективных генетических конструкций генов, кодирующих процессы, связанные с неспецифической и специфической устойчивостью растений к биотическим стрессам и болезням.

Ген FeSOD, кодирует Fe-зависимую супероксид дисмутазу из *Arabidopsis thaliana*, которая локализуется в цитозоле. Данный фермент является первым в каскаде нейтрализации активных форм кислорода и осуществляет их превращение в пероксид – H_2O_2 . Пероксид, в свою очередь, далее нейтрализуется другими антиокислительными ферментами, такими как аскорбат пероксидоксидаза, каталаза и др. Нейтрализация активных форм кислорода является важнейшим механизмом защиты от окислительного стресса, сопровождающего большинство абиотических и биотических воздействий.

Цель данного исследования: разработать этапы генетического конструирования на примере создания промоторной конструкции ключевого гена антиокислительного стресса FeSOD, кодирующего фермент Fe-зависимая супероксид дисмутаза, который придает растениям устойчивость к окислительному стрессу и неспецифическую устойчивость к различным видам абиотических и биотических стрессов за счет запуска сигнальных путей, связанных с подавлением активных форм кислорода (ROS).

Материалы и методы

Генетический материал: Конструкция гена анти-окислительного стресса FeSOD (Fe-зависимой супероксид дисмутазы – анти-ROS), экспрессионный вектор – растительная плаزمида pEXSOD10, CAMV35S промотор из вируса табачной мозаики, маркерный ген устойчивости к канамицину NPTII).

Методы: Создание эффективной генетической конструкции гена FeSOD осуществляли методами молекулярного клонирования генов [15]: выделение плазмидной ДНК; гель-электрофорез в 0,8% агарозном геле в TAE буфере с добавлением этидиума бромидом; выделение фрагментов ДНК из агарозного геля; подготовка компетентных клеток бактерий; бактериальная трансформация плазмидной ДНК с компетентными клетками; рестрикция плазмидной ДНК; лигирование фрагментов ДНК; идентификация и секвенирование генов с применением BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Использованы методы клонирования и конструирования генетических конструкций целевых генов с последующей их идентификацией совместно с ВНИИСХБ, РАСХН, Россия; ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН, Россия; НЦБ КН МОН РК; University of Illinois, USA.

Нуклеотидную последовательность генов определяли в базе нуклеотидов с помощью web.site NCBI. Праймеры рассчитывали с использованием компьютерных программ «Vector NTI», «Applied Biosystems» и др.

Аминокислотная и нуклеотидная последовательности гена FeSOD использованы по материалам NCBI Reference Sequence: NM_001036633.1 [16].

Подготовка праймеров для ПЦР: С использованием компьютерных программ «Vector NTI», «Applied Biosystem» и др. рассчитывали и готовили праймеры к генам, входящим в конструкции маркерных и целевых генов.

Два специфических праймера были подобраны к последовательности гена FeSOD для амплификации фрагмента величиной 645 пар оснований.

Гель-электрофорез в агарозе: В работе использовали 0,8% агарозу, приготовленную на ТАЕ буфере с добавлением этидиума бромида до конечной концентрации (0,5 мкг/мл). Электрофорез проводили в буферной системе ТАЕ.

Молекулярно-биологическая детекция интеграции целевого гена: Использовали следующие условия проведения реакции амплификации с геном FeSOD на ПЦР амплификаторе «Mastercycler® personal», Eppendorf, Germany – температура отжига, репликации, продолжительность синтеза ДНК, 35 число циклов, условия хранения продукта ПЦР.

Программа ПЦР для гена FeSOD: 94 °С – 3 мин, 94 °С – 45 сек, 60 °С – 45 сек, 72 °С – 1 мин.30сек, 72 °С – 10 мин., сохранение продукта ПЦР при -10°С. Продукты ПЦР разделяли с помощью агарозного гель-электрофореза.

Рестрикция векторов для трансформации растений; выделение фрагментов ДНК, несущих последовательность целевого гена. Рестрикцию ДНК проводили тупощепящими ферментами HindIII, XbaI, BamHI, фирмы Fermentas. Рестрикцию проводили в объёме 20 мкл: 2 мкл 10X буфера для соответствующей рестриктазы, нужный объём раствора плазмидной ДНК (в зависимости от концентрации), рестриктазы (в зависимости от активности), доводили до 20 мкл деионизированной водой MilliQ, инкубировали 1 - 1,5 часа при 37 °С.

В случае двойной рестрикции, если оптимальные буферы для каждой из рестриктаз не совпадали, после прохождения первой рестрикции 5 мкл рестрикционной смеси использовали для электрофореза в качестве контроля полноты рестрикции, а оставшийся объём (15 мкл) пересаждали 1,5 мкл 5М ацетата натрия и 45 мкл 96%-ного этанола, выдерживали 20 минут при -20°С, затем центрифугировали 10 мин. на центрифуге при 13400 об./мин. Дважды промывали осадок 80 % этиловым спиртом в количестве 500 мкл (каждый раз центрифугировали по 5 мин при 13400 об./мин.), подсушивали, растворяли в необходимом объёме MilliQ H₂O, добавляли 2 мкл 10X буфера и нужный объём рестриктазы.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля: 1. Участок геля с нужным фрагментом вырезали стерильным скальпелем и переносили в пробирку Eppendorf. 2. Добавляли 2.5VKI (7M) (250 мкл на 100 мкл агарозного фрагмента). Смесь инкубировали на водяной бане (600 °С) в течение 5 мин. 3. Добавляли 15 мкл раствора стеклянных бусинок (Glassmilk). Ресуспендировали на ворткексе. Переносили на 5 мин. в лед. 4. Центрифугировали в течение 10 сек. при 13400 об./мин. Надосадочную жидкость сливали. Осадок 3 раза промывали раствором New-washing (по 100 мкл). 5. Добавляли 5-15 мкл H₂O и ресуспендировали. Переносили пробирку на водяную баню (600°С) на 2 мин. 6. Центрифугировали при 13400 об./мин. в течение 15 сек. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. Последние четыре процедуры повторяли. Очищенные фрагменты ДНК использовали для дальнейшей работы.

Растворы: 10% Glassmilk: 10 мг silica в 100 мкл деионизированной H₂O. New-washing: 100 mM NaCl; 10 mM TrisHCl (pH 7.2); 1 mM EDTA; 50% этанол.

Определение нуклеотидной последовательности целевого гена. Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) ищелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas).

Реакцию секвенирования проводили с применением Big Dye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) в НЦБ КН МОН РК. Для генно-инженерных манипуляций препаративную наработку плазмиды проводили в клетках E.coli, в широко используемых штаммах JM109 или XL1 Blue.

Подготовка компетентных клеток бактерий: 1. Ночную культуру *E.coli* (штамм XL1 Blue) обновляли в новой LB среде (1:100). 2. К 10 мл среды добавляли 100 мкл ночной культуры и 10 мкл Тс (тетрациклина) до конечной концентрации 12.5 мкг/мл. Выращивали при 37 °С в течение 1.5-2 час., контролируя концентрацию клеток при оптической плотности OD 600. 3. Охлаждали на льду в течение 10 мин. Культуру стерильно разливали в стерильные пробирки Эппендорфа. 4. Центрифугировали в течение 30 сек. при 13400 об./мин. Надосадочную жидкость тщательно убирали (стерильно). 5. Добавляли 350 мкл CaCl₂ (стоковый раствор 0.1 М). Ресуспендировали. Переносили на лед и инкубировали в течение 40 мин. 6. Центрифугировали в течение 30 сек. при 13400 об./мин. Надосадочную жидкость тщательно убирали (стерильно). 7. Добавляли 200 мкл CaCl₂ (стоковый раствор 0.1 М) и аккуратно встряхивали. Полученные компетентные клетки использовали для бактериальной трансформации.

Проводили трансформацию агробактериального штамма полученной генно-инженерной конструкцией с добавлением конкретного антибиотика для каждой конструкции (спектиномицина для FeSOD, канамицина для других генов в концентрации от 70 до 100 мг/мл).

Трансформация *E. coli* плазмидной ДНК: 1. К компетентным клеткам добавляли плазмидную ДНК (1 мкг на 200 мкл клеток) или лигазную смесь (10 мкг на 200 мкл клеток). Переносили на 30 мин. в лед. 2. Проводили тепловой шок в течение 2 мин. при 42°C. Переносили клетки на 5 мин. в лед. 3. Добавляли в пробирки по 1мл LB среды (без антибиотика). Инкубировали при 37°C в течение 1 час. 4. Центрифугировали 45 сек. при 13400 об/мин. Надосадочную жидкость сливали и ресуспендировали в оставшейся среде. 5. Клетки высаживали в агаризованную LB среду, содержащую соответствующий антибиотик как селективный агент.

Растворы, используемые для этого метода: жидкая LB среда (на 1 л): бактотриптон 10 г; дрожжевой экстракт 5 г; NaCl 5 г; агаризованная LB среда (на 1 л): жидкая LB среда + бактоагар 15 г; ампициллин (до 2 мкл/мл)

Лигирование проводили в объеме 20 мкл: 2 мкл 10X буфера для T4-ДНК-лигазы. Необходимые объемы вектора и вставки, гидролизованных рестриктазами 0,7 мкл T4-ДНК-лигазы. Объём доводили MilliQ H₂O. Оптимальная температура лигирования 14 - 18°C, поэтому процесс проводили на водяной бане в течение 1,5 часов.

Результаты и их обсуждение

Известно, что при большинстве стрессов одним из наиболее значимых компартментов растительной клетки для сохранения ее нормальной жизнедеятельности является хлоропласт. По этой причине в генно-инженерной конструкции ген FeSOD снабжен сигнальной последовательностью, направляющей его белковый продукт в пластиду. По полученным ранее данным этот ген придавал растениям устойчивость к некоторым видам стресса: UV-облучение, засоление (NaCl, Na₂SO₄). Предполагается, что конструкция с данным геном сможет придавать устойчивость к холодному и осмотическому стрессу, затоплению и к некоторым видам биотических стрессов [17-19].

Сигнальная последовательность, направляющая продукт в хлоропласт. Данная сигнальная последовательность взята из гена малой субъединицы рибулозобисфосфат карбоксилазы-оксигеназы (Rubisco) гороха.

MASMISSAVTTVSRASTVQSAAVAPFGLKSMGTGFPVKKVNTDITSITSNGGRVKK

atggctctatgatatcctctcagctgtgactacagtcagccgtgctctacgggtgcaatcgccgcgggtgctccattcggcggcctcaaatccatg
actggattcccagttaagaaggtcaaacactgacattactccattacaagcaatggggaagagtaaaagtgc

Место стыка между сигнальной последовательностью и зрелым белком FeSOD

VKCM ↓ DL ↓ NYVL

GTAAAGTGCATGGATCTAAACTACGTCCTC

Стрелками обозначены конец сигнальной последовательности и начало зрелого белка FeSOD, между ними – введенные две лишние аминокислоты для обеспечения стыковки между сигналом и собственно белком ("взаимоуничтожившиеся" сайты рестриктаз BamHI и BglII).

Таким образом, расшифрованные аминокислотные и нуклеотидные последовательности данного гена анти-окислительного стресса FeSOD, кодирующего Fe-зависимую супероксид дисмутазу, позволили создать полную карту гена и использовать их для создания генетической конструкции.

Составление карты кассеты экспрессии. Как известно, экспрессионная кассета – фрагмент ДНК, в который может быть вставлена чужеродная ДНК в целях обеспечения ее экспрессии в клетке. Экспрессионная кассета, как правило, является частью экспрессионного вектора и содержит все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена. Одним из ключевых генетических элементов кассеты экспрессии является промотор – участок ДНК, обеспечивающий эффективное связывание РНК-полимеразы и высокую скорость синтеза матричной РНК. Для трансформации в работе был выбран мощный конституционный промотор из вируса табачной мозаики – CAMV35S. Промотор CAMV35S обеспечивает транскрипцию в любых гено-мах растений. Промотор CAMV35S является конститутивным, что обеспечивает постоянную, сильную экспрессию гена, который находится под его регуляцией, во всех тканях трансгенного растения. В ряде случаев при трансформации растительной клетки в геноме все равно заменяют его собственный промотор на промотор CAMV35S как более сильный, чтобы повысить выход белкового продукта [20].

Уникальные сайты рестрикции – EcoRV (рестриктаза II типа) и HindIII (сайт-специфическая ДНК рестриктаза II типа).

Таким образом, карта кассеты экспрессии содержит CAMV35S промотор из вируса табачной мозаики для трансформации целевого гена в двудольные растения, последовательность целевого гена FeSOD, полиА стоп кодон, уникальные сайты рестрикции (рисунок 1).

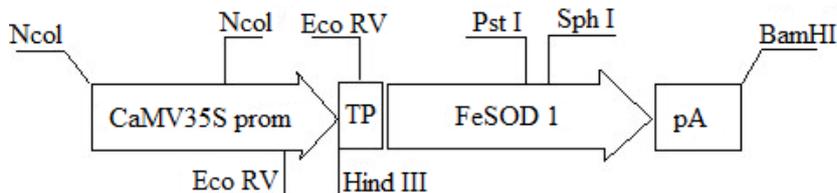


Рисунок 1 – Карта кассеты экспрессии гена FeSOD

Вставка кассеты экспрессии с целевым геном FeSOD в Т-область. Созданная карта кассеты экспрессии гена FeSOD далее была вставлена в карту Т-области плазмидного вектора pEXSOD10.

Карта Т-области гена FeSOD от левого борта к правому содержит: сигнальную последовательность, направляющую продукт в хлоропласт OCS, маркерный ген устойчивости к канамицину NPTII, NOS-промотор для этого гена, промотор из вируса табачной мозаики для интродукции целевого гена в двудольные растения сои, последовательность целевого гена FeSOD, поли А сигнал – стоп кодон, т.е. представляет линейную конструкцию с минимальным набором необходимых генетических элементов для интродукции гена в растение (рисунок 2).

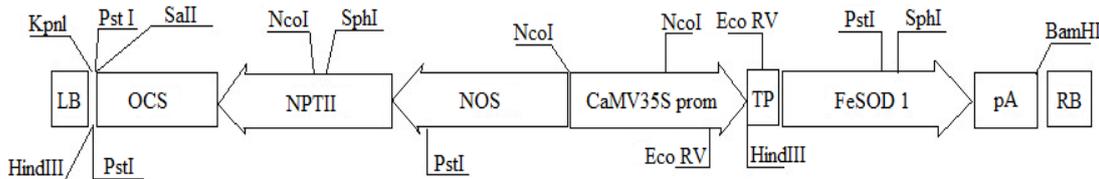


Рисунок 2 – Карта Т-области гена FeSOD

Создание карты экспрессионного вектора, содержащего Т-область. Общеизвестно, что термин «экспрессионный вектор» означает плазмидную ДНК, содержащую все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в нее целевого гена, промотор и терминатор, и элементы для амплификации экспрессионной кассеты и отбора клонов с множественными копиями экспрессионной кассеты в геноме.

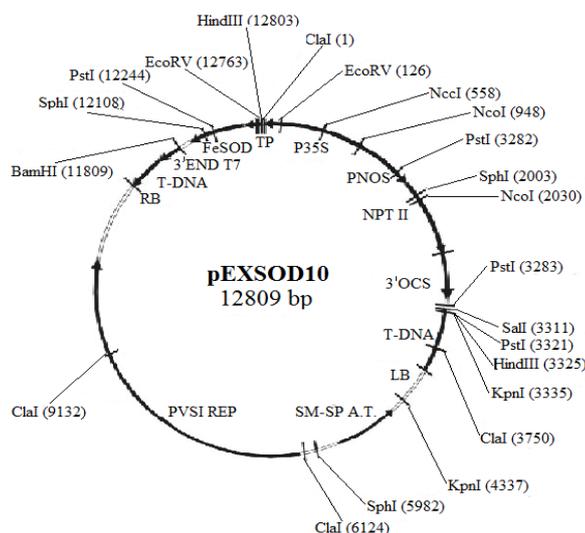


Рисунок 3 – Карта экспрессионного вектора, содержащего Т-область гена FeSOD

Полученная кассета экспрессии была клонирована в экспрессионный вектор pEXSOD10. Таким образом, экспрессионный вектор – растительная плазида pEXSOD10 размером 12809 п.о., содержит Т-область гена FeSOD и необходимые сайты рестрикции (рисунок 3).

Созданный экспрессионный вектор использовали для дальнейших генетических манипуляций.

Подбор праймеров к последовательности целевого гена и ПЦР. Праймер – это короткая последовательность, которая соединяется с одной цепью ДНК и обеспечивает свободный 3'ОН конец, с которого ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

Поэтому на данном этапе был осуществлен поиск праймеров к последовательности гена антиокислительного стресса FeSOD.

В ходе исследования, два специфических праймера, были подобраны к последовательности гена FeSOD для амплификации фрагмента величиной 645 пар оснований:

Прямой праймер FeSOD 5'-ACCTCCATTCGCACTGGATGCTTT-3',

обратный праймер FeSOD 5'-TTCGGTGATGCAGAACTCACTGT-3'.

Проведен ПЦР с фрагментом целевого гена FeSOD (рисунки 4 и 5).

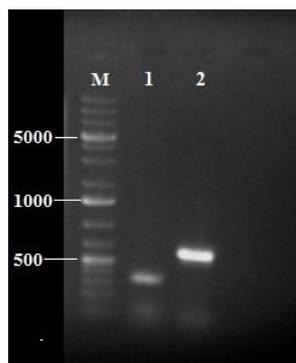


Рисунок 4 – Гель-электрофорез с продуктами ПЦР генов *As** и *FeSOD*. Слева направо: М – маркер; 1 – ген *As*; 2 – ген *FeSOD*

(*Примечание: клонирование гена *As*, кодирующего хитин-связывающий белок из *Amarantus caudatus* в данной статье не рассматривается.)

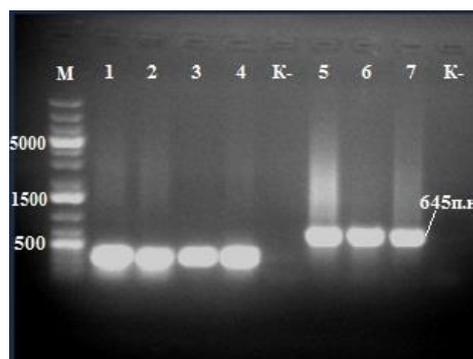


Рисунок 5 – Электрофореграммы ПЦР амплификации фрагментов целевых генов *As* и *FeSOD* размером 350 и

645 п.о. соответственно. Слева направо: М – маркер;

1-4 – продукты ПЦР фрагмента целевого гена *As*; К – контроль; 5-7 – электрофореграммы продуктов ПЦР фрагмента целевого гена *FeSOD*, соответствующего 645 п.о.)

Рекомендуемая амплификационная смесь содержала 100 нг ДНК, 3мМ $MgCl_2$, 250 μ MdNTPs, 0,25 μ M каждого праймера, 1 x PCR буфер и 1 ед. Таq-полимеразы (СибЭнзим) в реакционном объеме 20 мкл. ПЦР проводили при следующем режиме: 94°C – 3 мин., далее 40 циклов 94 °C – 45 сек., 60 °C – 45 сек., 72 °C – 1 мин. 30 сек., и конечная элонгация при 72 °C – 10 мин.

Продукты ПЦР разделяли с помощью агарозного гель-электрофореза. Показано наличие бендов, соответствующих 645 п.о.– величине фрагмента гена *FeSOD*.

Трансформация полученной генно-инженерной конструкции *Agrobacterium tumefaciens*. Следующим этапом генетических манипуляций является введение рекомбинантной ДНК в клетку хозяина, то есть трансформация. Для увеличения проницаемости клеточных мембран на них воздействуют электрическим током – электропорация. Условия ее проведения были стандартными. Клеточную суспензию (50 мкл) и ДНК помещали в сосуд с погруженными в него электродами и подавали единичный импульс тока длительностью 4,5 мс (емкость конденсатора 25 мкФ), напряжение 2,5 кВ, сопротивление 200 Ом.

Полученный бинарный экспрессионный вектор pEXSOD10 был внедрен с помощью процедуры электропорации в компетентные клетки штамма ЕНА 105 *Agrobacterium tumefaciens*. Клетки агробактерии были высеваны на агаризованную стандартную среду LB, на которой обычно выращивают бактериальные клетки *E. coli*, с добавлением антибиотика спектиномицина в концентрации от 70 до 100 мг/мл (рисунок 6).



Рисунок 6 – Экспрессионный вектор pEXSOD10, несущий T-область гена FeSOD, трансформированный в *Agrobacterium tumefaciens*

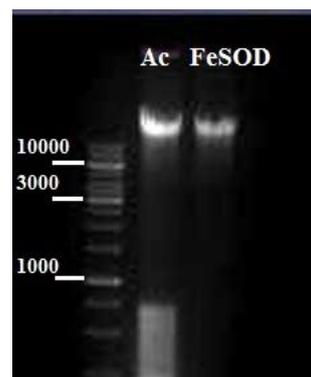


Рисунок 7 – Электрофореграмма плазмидной ДНК фрагментов генов Ac и FeSOD размером около 13 500 п.о.

Колонии появлялись на вторые сутки культивирования при 28°C. Об эффективности трансформации судили по результатам молекулярной детекции.

Подтверждение наличия агробактериальной трансформации конструкции посредством выделения плазмидной ДНК из клеток *Agrobacterium tumefaciens*. Для подтверждения наличия введенного экспрессионного вектора внутри агробактериальных клеток была выполнена процедура выделения плазмидной ДНК из клеток *Agrobacterium tumefaciens*. Бактериальную суспензию наращивали в жидкой среде LB в 300 мл колбах с интенсивным качанием. Антибиотик спектиномицин добавляли в концентрации приблизительно 70-100 мг/мл. Методика выделения стандартная – щелочной лизис [15], подробно описанный в разделе «Методы исследований». Для генно-инженерных манипуляций препаративную наработку плазмиды проводили в клетках *E. coli*, в штамме JM109.

Для агробактериального штамма – использовали антибиотик – спектиномицин, для отбора трансформированных растений на следующих этапах исследования будет использован антибиотик – канамицин.

Для подтверждения включения фрагмента целевого гена FeSOD в плазмиду pEXSOD10 выделена плазмидная ДНК и проведен ее электрофорез по описанному выше методу (рисунок 7).

Показано наличие четких бендов, соответствующих размерам плазмиды плюс фрагмент гена FeSOD (12809 + 645 = 13 454 п.о.), в сумме составляющих около 13 500 п.о.

Идентификация и секвенирование гена FeSOD. Анализ нуклеотидных последовательностей данного гена. Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas). Реакцию секвенирования проводили с применением Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности и результаты идентификации представлены в таблице.

Определение нуклеотидной последовательности гена FeSOD было осуществлено методом прямого секвенирования фрагментов с прямого и обратного праймеров.

Нуклеотидные последовательности этих генов были проанализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров; фрагменты, имеющие низкий показатель качества) что позволило получить нуклеотидные последовательности протяженностью 502 и 483 п.о. с прямым и обратным праймером для гена FeSOD.

Результаты секвенирования методом анализа нуклеотидной последовательности гена FeSOD

Наименование образца	Праймер	Полученные нуклеотидные последовательности
Ген FeSOD	Прямой 502 п.о.	<p>ACTCTGGAGTTTCACTGGGGAAACATCACAGAAGCTTACGT GGACAACCTCAAGAAACAGGTTCTTGGAACCGAGCTTGAAGGC AAGCCCTTAGAGCACATTATCCACAGCACTTACAACAATGGTG ATCTCCTCCCTGCTTTCACAACGCTGCTCAGGCGTGGAACCAC GAGTTCTTCTGGGAGTCAATGAAACCAGGTGGTGGAGGAAAAC CATCAGGAGAGCTTCTTGCTTTGCTTGAAAGAGATTTCACTTCT TATGAGAAGTTCTATGAAGAGTTCAATGCTGCTGCAGCCACTCA GTTTGGAGCTGGCTGGGCCTGGCTTGCTTATTCAAATGAAAAC TCAAAGTAGTGA AAACTCCCAATGCTGTGAATCCCCTTGTGCTC GGCTCTTCCCATTGCTTACCATTGATGTCTGGGAGCATGCTTA CTACCTTGACTTCCAGAACCGAAGACCAGATTACATAAAGACA TTCATGACCAATCTTGTGTCTTGGG</p>
	Обратный 483 п.о.	<p>GCTTGAAGGCAAGCCCTTAGAGCACATTATCCACAGCACTT ACAACAATGGTGATCTCCTCCCTGCTTTCACAACGCTGCTCAG GCGTGGAAACCACGAGTTCTTCTGGGAGTCAATGAAACCAGGTG GTGGAGGAAAACCATCAGGAGAGCTTCTTGCTTTGCTTGAAAG AGATTTCACTTCTTATGAGAAGTTCTATGAAGAGTTCAATGCTG CTGCAGCCACTCAGTTTGGAGCTGGCTGGGCCTGGCTTGCTTAT TCAAATGAAAAC TCAAAGTAGTGA AAACTCCCAATGCTGTGA ATCCCCTTGTGCTCGGCTCTTCCCATTGCTTACCATTGATGTCT GGGAGCATGCTTACTACCTTGACTTCCAGAACCGAAGACCAGA TTACATAAAGACATTCATGACCAATCTTGTGTCTTGAGAAGCTG TAAGTGCCAGACTTGAAGGCCGCCAAAGGCTGCTTCTGCTGAA AGCAAG</p>

Секвенированные нуклеотидные последовательности были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Показано, что секвенированная с прямым праймером нуклеотидная последовательность размером 502 п.о. идентична фрагменту к ДНК копии гена FeSOD, с 171 по 673 п.о. Секвенированная с обратным праймером нуклеотидная последовательность размером 483 п.о. идентична фрагменту к ДНК копии гена FeSOD с 246 по 924 п.о., использованному нами для создания генетической конструкции.

Целевой ген в созданных генетических конструкциях идентифицирован с исходными нуклеотидными последовательностями NCBI.

Таким образом, поставленная цель исследования – создание генетической конструкции гена, кодирующего фермент Fe – зависима супероксид дисмутаза, придающим устойчивость к окислительному стрессу и неспецифическую устойчивость к различным видам абиотических и биотических стрессов, была достигнута. Поэтапно описаны стадии конструирования целевого гена. Предложенная генетическая конструкция гена анти-окислительного стресса FeSOD (Fe-зависимой супероксид дисмутаза) может быть использована как модель клонирования генов при создании трансгенных растений.

ВЫВОДЫ. Представлена информация о ключевом гене анти-окислительного стресса FeSOD (Fe-зависимой супероксид дисмутаза), его функции.

Исследована последовательность генов: нуклеотидная последовательность к ДНК копии генов; аминокислотная последовательность белков, кодируемых данным геном; клонированы сигнальная последовательность, направляющая продукт в хлоропласт.

Созданы кассеты экспрессии данного целевого гена.

Сконструирована карта T-области.

Представлена карта экспрессионного вектора, содержащего T-область.

Для подтверждения экспрессии гена проведены подбор праймеров к последовательности целевого гена, ПЦР-анализ, рестрикции по специфическим сайтам.

Проведена трансформация агробактериальных штаммов полученными генно-инженерными конструкциями.

Подтверждено клонирование генетических конструкций посредством выделения плазмидной ДНК из клеток *Agrobacterium tumefaciens*, ПЦР, рестрикции и электрофореза в агарозном геле.

Проведены идентификация и секвенирование гена анти-окислительного стресса FeSOD.

Выражение благодарности. Выражаем глубокую благодарность сотрудникам: ВНИИСХБ, РАСХН, Россия; Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Россия; НЦБ КН МОН РК; University of Illinois at Urbana - Champaign, USA, за содействие в создании генетической конструкции и идентификации гена FeSOD.

Финансирование. НИР профинансирована по проекту «Улучшение устойчивости сои к биотическим стрессам путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла» выполненному в рамках подпрограммы 101 «Грантовое финансирование научных исследований». Приоритет «Интеллектуальный потенциал страны» 2013–2015 гг.

МАЙБҰРШАҚТЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТРАНСФОРМАЦИЯСЫНА АРНАЛҒАН АНТИ-ОКСИДАНТТЫҚ FESOD ГЕНДІ ҚҰРАСТЫРУ

О.И. Кершанская¹, М.А. Абдулжанова¹, М.М. Исмаилова¹,
С.К. Даулетбаева¹, А.А. Гулевич²

¹РМК Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы Институты ҒК БҒМ ҚР,
Алматы, Қазақстан,

²АШРҒА Ауылшаруашылық биотехнология ғылыми-зерттеу институты, Мәскеу, Ресей

Аннотация. Биотехнологияның геномнан кейінгі жаңа ғасырындағы фенилпропаноидты цикл сияқты негізгі метаболитті жолдардың генетикалық инженериясы, ауыл шаруашылығы дақылдарын жақсартудың әсерлі әдісі болып табылады. Бүгінгі күні өсімдіктерді стресстерге қарсы генетикалық жақсарту, бағдар беретін бір немесе бірнеше гендердің немесе осы мақсатқа пайдаланылатын кодтайтын ферменттердің әсеріне байланысты. Орындалып отырған ғылыми ізденістің мақсаты, (ROS) белсенді оттегі формаларының бағдарлы жолдарын іске қосу арқылы, өсімдіктердің қышқылдық және биотикалық стресстерге төзімділігін арттыратын, Fe-бағынышты супероксид дисмутаза ферментін кодтайтын негізгі FeSOD генінің генетикалық конструкцияларын құрастыру болып табылды. FeSOD мақсатты генінің тиімді генетикалық конструкциясын құрастыру, зерттеу барысында жақсартылған гендерді молекулярлы клондау әдісімен жүргізілді. Негізгі нәтижелер: аминқышқылды және нуклеотидті тізбек зерттелді; FeSOD мақсатты генінің T-аймағының бағдарлы тізбегі кодталды, экспрессия кассетасы және картасы құрастырылды. Ген pEXSOD10 өсімдік плазмидасына клондалды және ЕНА105 штаммды *Agrobacterium tumefaciens*-ке трансформацияланды. Аталған геннің клондануы және танылуы ПЦР, кесу және орнын анықтау әдістерімен расталды. Осылайша, өсімдіктер трансформациялауға арналған FeSOD генінің генетикалық конструкциясы жасалды.

Тірек сөздер: генетикалық инженерия, FeSOD генінің 35 S промоторлы конструкциясы, агробактериалды трансформация, молекулярлы идентификация, қышқылдану стресі, май бұршақ.

CONSTRUCTION OF THE FeSOD ANTI-OXIDATIVE STRESS GENE FOR THE GENETIC TRANSFORMATION OF SOY

O.I. Kershanskaya¹, M.A. Abdulzhanova¹, M.M. Ismailova¹,
S.K. Dauletbaeva¹, A.A. Gulevich²

¹RGP Institute of Plant Biology and Biotechnology of the KN MES RK, Almaty, Kazakhstan,

²Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology RASKHN, Moscow, Russia

Annotation. Genetic engineering of key metabolic pathways, such as the phenylpropanoid cycle, is a powerful means of improving crops at a new stage of biotechnology in the post-genomic era. To date, advances in the genetic improvement of plants to the action of stresses are associated with the manipulation of one or more genes involved in signaling/regulatory pathways, or coding enzymes involved in these pathways. The aim of this study is to develop the stages of genetic design on the example of creating a promoter structure of the key antioxidant stress gene FeSOD, encoding the enzyme Fe-dependent superoxide dismutase, which gives plants resistance to oxidative stress and non-specific resistance to various types of abiotic and biotic stresses, by triggering signaling pathways associated with active oxygen forms (ROS). The creation of effective genetic constructs of the target FeSOD gene was carried out by methods of molecular gene cloning optimized during the research work. Main results: amino acid and nucleotide sequences were studied; signal sequences were cloned, expression cassettes were created, maps of the T-region of the target FeSOD gene were created. The gene was cloned into the plant plasmid pEXSOD10 and transformed into *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA105. The cloning and identification of this gene was confirmed by PCR, restriction and sequencing methods. Thus, a genetic construct of the FeSOD gene for plant transformation was created.

Key words: genetic engineering, promoter construction of the FeSOD gene, agrobacterial transformation, molecular identification.

ЖИТЕПАТЫПА

1 Lygin A.V., Abdel-Rahman M.M., Ulanov A.V., Widholm J.M., Lozovaya V.V. Polyethylene glycol treatment promotes metabolic events associated with maize callus morphogenic competence // *Phytochemistry*. – 2012. – Vol. 82. – P. 46-55.

2 Zernova O., Lygin A., Hill C., Widholm J., Lozovaya V. Genetic Engineering of Soybean Plant Innate Resistance // *Soy Poster Abstracts*. – USA, 2012. – P. 127.

3 Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F.L. Biotechnological approaches to study plant responses to stress // *Bio Med Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – 10 p.

4 Cabane M., Afif D., Hawkins S. Regulation of plant response to abiotic stresses // *Advances in Botanical Research*. – 2012. – Vol. 61. – P. 219-262.

5 Shou H., Palmer R.G. and Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol. 20. – P. 325-334.

6 Paz, M.M.; Martinez, J.C.; Kalvig, A.B.; Fonger, T.M.; Wang, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation // *Plant Cell Reports*. – 2005. – Vol. 25. – P. 206-213.

7 Li, Z., Nelson R., J. Widholm J., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. – Univ. of Illinois, Urbana, 2009. – Web site.

8 Li Z., Nelson R.L., Widholm J.M., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway // *Soybean Genet Newslett.* – 2002. – Vol. 29. – P. 1-11.

9 Пат. 20088867598 СИИА. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free sm GFP cassette into soybean via ovary-drip transformation / Liu J., Su Q., An L. and Yang A. 2009.

10 Пат. 20090077694 СИИА. Soybean transformation method / Martinell B.J., Julson L.S., Emler C.A., Huang Y., McCabe D.E., Williams E.J. 19.03.2009.

- 11 Yin X., Zhang Z.J. Recent patents on plant transgenic technology // RIKEN Plant Science Center. – 2010. - P. 1-22.
- 12 Hui L., Tian-long W. Transforming agrobacterium into soybean by means of pollen tube pathway induced by CaCl₂ // Jiaotong University, Shanghai. – 2011. - Vol. 01. – P. 1.
- 13 Kershanskaya O.I. Germ-line Plant Transformation Technologies in Wheat and Soybean // Plant transformation technologies II. – Intern. Conference, Vienna, Austria. – 2011. P. 17-18.
- 14 McWilliams D.A., Berglund D.R., Endres G.J. Soybean Growth and Management Quick Guide // NDSU Institutional Repository. – 2004. - Vol. 8. – P. A1174.
- 15 Маниатис Т., Фрэнч Э., Сэмбук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 282 с.
- 16 Mayer K. et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. – 1999. – Vol. 402(6763). – P. 769-777.
- 17 Myouga et al. A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in *Arabidopsis* // The Plant Cell. – 2008. – Vol. 20. – P. 3148-3162.
- 18 Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Enzymes in Leaves of Transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* Plants, with FeSOD1 Gene // Russian Agricultural Sciences. – 2010. - Vol. 36, N 4. – P. 242-249.
- 19 Van Camp W. et al. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli* // PNAS. – 1990. – Vol. 87. – P. 9903-9907.
- 20 Odell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter // Nature. – 1985. – Vol. 313. – P. 810-812.

REFERENCES

- 1 Lygin A.V., Abdel-Rahman M.M., Ulanov A.V., Widholm J.M., Lozovaya V.V. Polyethylene glycol treatment promotes metabolic events associated with maize callus morphogenic competence. *Phytochemistry*, 2012, 82, 46-55.
- 2 Zernova O., Lygin A., Hill C., Widholm J., Lozovaya V. Genetic Engineering of Soybean Plant Innate Resistance. *Soy Poster Abstracts, USA, 2012*, 127.
- 3 Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F.L. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *Bio Med Research International*, 2013, 2013, 10
- 4 Cabane M., Afif D., Hawkins S. Regulation of plant response to abiotic stresses. *Advances in Botanical Research*, 2012, 61, 219-262.
- 5 Shou H., Palmer R.G. and Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2011, 20, 325-334.
- 6 Paz, M.M.; Martinez, J.C.; Kalvig, A.B.; Fonger, T.M.; Wang, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Reports*, 2005, 25, 206-213.
- 7 Li. Z., Nelson R., J. Widholm J., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. *Univ. of Illinois. Urbana.et al.*, 2009. Web site.
- 8 Li Z., Nelson R.L., Widholm J.M., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. *Soybean Genet Newslett*, 2002, 29, 1–11.
- 9 Liu J., Su Q., An L., Yang A. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free sm GFP cassette into soybean via ovary-drip transformation. *Patent USA no 20088867598*, 2009.
- 10 Martinell B.J., Julson L.S., Emler C.A., Huang Y., McCabe D.E., Williams E.J. Soybean transformation method. *Patent USA no 0090077694*, 19.03.2009.
- 11 Yin X., Zhang Z.J. Recent patents on plant transgenic technology. RIKEN Plant Science Center, 2010, 1-22.
- 12 Hui L., Tian-long W. Transforming agrobacterium into soybean by means of pollen tube pathway induced by CaCl₂. *Jiaotong University, Shanghai*, 2011, 01, 1.

13 Kershanskaya O.I. Germ-line Plant Transformation Technologies in Wheat and Soybean. Plant transformation technologies II. Intern. Conference, Vienna, Austria. 2011, 17-18.

14 McWilliams D.A., Berglund D.R., Endres G.J. Soybean Growth and Management Quick Guide. NDSU Institutional Repository, 2004, 8, A1174.

15 Maniatis T., Frech E., Sambuk D. Molecular cloning. Moscow, 1984, 282.

16 Mayer K. et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 1999, 402(6763), 769-777.

17 Myouga et al. A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 2008, 20, 3148–3162.

18 Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Enzymes in Leaves of Transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* Plants, with FeSOD1 Gene. Russian Agricultural Sciences, 2010, 36. № 4, 242–249.

19 Van Camp W. et al. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic comple-mentation in *Escherichia coli*. PNAS, 1990, 87, 9903-9907.

20 Odell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. Nature, 1985, 313, 810-812.

МАЗМУНЫ – СОДЕРЖАНИЕ – CONTENTS

Vaibussenov K.S.LONG-TERM ANALYSIS OF HARMFUL GRASSHOPPERS POPULATION
DYNAMICS - SHAPING FACTOR OF FORECASTING THEIR ABUNDANCE.....5**Чоманов У.Ч., Жумалиева Г.Е., Нурынбетова Г.**ИЗУЧЕНИЕ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ
ЦЕННОСТИ МАЛОЦЕННОГО РЫБНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....12**Nurgazy K.Sh., Kayrullaev K.K., Kulmanova G.A., Nurgazy B.O.,
Iskakbaeva A., Turganbaeva F.A.**HISTOLOGICAL CHANGES OF STURGEON
FISHES IN RESERVOIRS OF ZHARKENT REGION.....24**Грабовский С.С., Грабовская А.С.**КОРРЕКЦИЯ ПЕРЕДУБОЙНОГО СТРЕССА У ЛАБОРАТОРНЫХ
ЖИВОТНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ.....28**Сулейменова Н.Ш., Филипова М., Добринов В., Абилдаев Е.С., Жараспаева С.М.**

СОВРЕМЕННЫЕ ПЕСТИЦИДЫ ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ РАПСА И СОИ.....35

Даутканов Н.Б., Убекова С.Б., Даутканова Д.Р.

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ КАЧЕСТВА СЕМЕННОЙ КУКУРУЗЫ.....41

Саданов А.К., Дадонова Т.Н., Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А.СПОСОБЫ И ДОЗЫ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН БОБОВЫХ
КУЛЬТУР ПРЕПАРАТАМИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ.....48**Хусаинова Э.М., Бекманов Б.О., Жунусбекова Б.Б., Амиргалиева А.С., Муратова Ф.Т**АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ
ATM И *TP53* С ФАКТОРОМ ОБЛУЧЕНИЯ В КАЗАХСТАНСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ.....53**Кершанская О.И., Абдулжанова М.А., Исмаилова М.М., Даулетбаева С.К., Гулевич А.А.**КОНСТРУИРОВАНИЕ ГЕНА АНТИ-ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
СТРЕССА *FESOD* ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СОИ.....62**Отеули Е.**ЦЕНТР АМБУЛАТОРНОГО ГЕМОДИАЛИЗА «ФРЕЗЕНИУС МЕДИКАЛ КЕЙР КАЗАХСТАН».
ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ.....75

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайтах:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

<http://biological-medical.kz/index.php/en/>

Редакторы: М.С. Ахметова, Д.С. Аленов, А. Ботанқызы
Верстка на компьютере Зикирбаева В.С.

Подписано в печать 15.12.2020.

Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
4,6 п.л. Тираж 300. Заказ 6.