



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Dorotėja Vaitiekūnaitė

**EKSTRALAŠTELINĮ Matriksą Imituojančio Chimerinio
Peptido Gamyba *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota*
Augalinėse Raiškos Sistemose**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovai

Dr. Vilija Kriščiūnienė (KTU)

Dr. Rytis Rugienius (LAMMC SDI)

Konsultantas

Dr. Danas Baniulis (LAMMC SDI)

KAUNAS, 2018

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**EKSTRALAŠTELINĮ Matriksą imituojančio chimerinio
peptido gamyba *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota*
augalinėse raiškos sistemose**

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

Vadovai

(parašas) Dr. Vilija Kriščiūnienė (KTU)
(data)

(parašas) Dr. Rytis Rugienius
(LAMMC SDI)

(data)

Recenzentė

(parašas) Dr. Vida Malinauskienė
(data)

Projektą atliko

(parašas) Dorotėja Vaitiekūnaitė
(data)

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Dorotėja Vaitiekūnaitė

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija, 621J70004

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Ekstraląstelinį matriksą imituojančio chimerinio peptido gamyba *Nicotiana tabacum* ir
Daucus carota augalinėse raiškos sistemose“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 ____ m. _____ d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Dorotėjos Vaitiekūnaitės**, baigiamasis projektas tema „Ekstraląstelinį matriksą imituojančio chimerinio peptido gamyba *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota* augalinėse raiškos sistemose“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

IVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1. Audinių inžinerija.....	12
1.2. Ekstraląstelinį matriksą imituojantis chimerinis peptidas.....	14
1.2.1. Lamininas.....	14
1.2.2. Fibronektinas.....	16
1.2.3. Elastinas.....	18
1.3. Rekombinantinių augalų gamybos augaluose metodologija.....	19
1.3.1. „GoldenBraid“ daugianario surinkimo reakcija.....	19
1.3.2. Augalų transformacija.....	20
1.3.2.1. Augalų transformacija naudojant <i>Agrobacterium tumefaciens</i> bakterijas.....	22
1.3.2.2. Protoplastų transformacija.....	24
1.3.2.3. Lapo disko transformacija.....	25
1.3.2.4. Ląstelių suspensijos transformacija.....	25
1.3.2.5. Hipokotilių transformacija.....	26
1.4. Baltymų raiškos sistemos augaluose.....	26
1.4.1. <i>Nicotiana tabacum</i> raiškos sistema.....	27
1.4.2. <i>Daucus carota</i> raiškos sistema.....	28
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI.....	30
2.1. Chimerinis peptidas.....	30
2.2. Chimerinio peptido vektoriaus konstrukcijos kūrimas ir <i>E. coli</i> bakterijų transformacija.....	30
2.3. Chimerinio peptido vektoriaus gryninimas.....	32
2.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformacija.....	32
2.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> kolonijų PGR ir elektroforezė.....	33
2.6. Protoplastų išskyrimas.....	34
2.6.1. <i>Nicotiana tabacum</i> protoplastų išskyrimas.....	34
2.6.2. <i>Daucus carota</i> protoplastų išskyrimas.....	36
2.7. Lapo disko transformacija.....	36
2.7.1. <i>Nicotiana tabacum</i> lapo disko transformacija ir ūglių regeneracija Nr. 1.....	36
2.7.2. <i>Nicotiana tabacum</i> lapo disko transformacija ir ūglių regeneracija Nr. 2.....	37
2.8. <i>Daucus carota</i> ląstelių suspensijos transformacija ir kalių regeneracija.....	38
2.9. <i>Daucus carota</i> hipokotilių transformacija ir kalių regeneracija.....	40
2.10. <i>Daucus carota</i> hipokotilių DNR išskyrimas.....	42

2.11. <i>Daucus carota</i> hipokotilių PGR ir elektroforezė	42
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	44
3.1. Binarinio augalų vektoriaus kūrimas ir pagausinimas <i>E. coli</i> ląstelėse	44
3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> konstruktas	45
3.3. Protoplastų išskyrimas iš <i>Nicotiana tabacum</i> ir <i>Daucus carota</i>	46
3.4. <i>Nicotiana tabacum</i> lapo disko transformacija ir augalo regeneracija	55
3.5. <i>Daucus carota</i> suspensijos transformacija	62
3.6. <i>Daucus carota</i> hipokotilių transformacija ir kaliaus regeneracija	63
3.7. <i>Daucus carota</i> transformuotų hipokotilių įvertinimas	64
4. REKOMENDACIJOS.....	66
IŠVADOS.....	70
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	71

Vaitiekūnaitė, Dorotėja. Ekstraląstelinį matriksą imituojančio chimerinio peptido gamyba *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota* augalinėse raiškos sistemose. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovai dr. Vilija Kriščiūnienė ir dr. Rytis Rugienius; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Technologijų mokslai, Biotechnologijos.

Reikšminiai žodžiai: *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*, augalų raiškos sistema, ekstraląstelinis matriksas, rekombinantinis peptidas, transgeninis augalas, audinių inžinerija, dirbtinis organų karkasas.

Kaunas, 2018. 67 p.

SANTRAUKA

Pagrindinis audinių inžinerijos tikslas yra atstatyti ir pagerinti audinių ir organų funkcionalumą. Nauji mokslo pasiekimai šioje srityje sukūrė galimybę laboratorijose užauginti organus naudojant dirbtinį ekstraląstelinį matriksą, ląsteles ir bioaktyvias molekules. Vis dar susiduriama su tam tikrais sunkumais naudojant šį metodą, iš kurių vienas pagrindinių yra organo dirbtinio karkaso biologinis efektyvumas. Organo karkasas imituoja audinių natyviąją architektūrą ir aplinką bei dalyvauja daugelyje ląstelių procesų. Šiai funkcijai atlikti laboratorijose naudojamos ekstraląstelinio matrikso molekulės, dažniausiai įvairūs rekombinantiniai baltymai.

Ekstraląsteliniai baltymai yra didelės molekulinės masės struktūros, tad jų gamyba šiuo metu plačiai naudojamose bakterinės raiškos sistemose yra problematiška. Alternatyva šiam metodui yra augalinės raiškos sistemos. Palyginus su bakterinėmis raiškos sistemomis, augalinės sistemos pasižymi daugeliu pranašumų, tad šis metodas yra patrauklus siekiant didelio masto gamybos.

Šio tyrimo metu buvo tirta ekstraląstelinį matriksą imituojančio chimerinio peptido gamyba *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota* augalinėse raiškos sistemose. Abu šie augalai plačiai naudojami rekombinantinių peptidų gamyboje.

Bandymo eigoje buvo sukurtas tikslinį geną nešantis binarinės sistemos vektorius ir transgeninių *Agrobacterium tumefaciens* bakterijų kamienas, kuris toliau buvo naudotas augalų transformacijai. Buvo bandoma transformuoti tabako protoplastus ir lapo diskus bei morkos ląstelių suspensiją ir hipokotilius. Lapo diskų, ląstelių suspensijos ir hipokotilių transformacija buvo įvertinta regenerantus auginus naudojant selektyvias terpes. Morkų hipokotilių transformacija taip pat buvo įvertinta atlikus jų DNR kapiliarinės elektroforezės analizę.

Vaitiekunaite, Doroteja. *Production of Extracellular Matrix Mimicking Chimeric Protein in Nicotiana Tabacum and Daucus Carota Plant Expression Systems: Master's thesis in Industrial Biotechnology / supervisors prof. Vilija Krisciuniene and prof. Rytis Rugienius. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Study field and area: Technology sciences, Biotechnology.

Key words: *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*, plant expression system, extracellular matrix, recombinant protein, transgenic plant, tissue engineering, artificial scaffold.

Kaunas, 2018. 67 p.

SUMMARY

Tissue engineering's main goal is to restore and improve the functionality of damaged tissues or organs. New advances in this field have created a possibility to grow artificial organs in a lab using artificial extracellular matrix, cells and bioactive compounds. The method still has some issues, the main one being the biological efficiency of the artificial scaffold. The scaffold mimics the native tissue architecture and environment as well as participates in many cellular processes. To fulfil this function labs use extracellular compounds, specifically recombinant proteins.

Extracellular proteins have high molecular weight, so their production using commonly used bacterial expression systems is problematic. As an alternative for this method, plant based expression systems are used. Compared to bacterial expression systems, plant based ones have many advantages and so this method is more appealing to use for mass production.

The production of extracellular matrix mimicking protein in *Nicotiana tabacum* and *Daucus carota* plant expression systems was investigated. Both of these plants are widely used for the production of recombinant proteins.

Binary system vector, carrying the gene for the chimeric protein, was constructed and a transgenic *Agrobacterium tumefaciens* line was created. The bacteria were later used for plant transformation. The transformation of tobacco protoplasts and leaf discs as well as carrot cell suspension and hypocotyls was attempted. The transformation success of the leaf discs, cell suspension and hypocotyls was assessed by using selective growth mediums. The transformation success of carrot hypocotyls was also assessed by doing capillary electrophoresis on their DNA.

SANTRUMPOS

2.4D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (fitohormonas auksinas)

a. r. – amino rūgštis

apm – apsisukimai per minutę

AS – acetosiringonas

B5 – Gamborg'o bazinė terpė

BA – 6-benziladeninas (fitohormonas citokininas)

BAP – 6-benzilaminopurinas (fitohormonas citokininas)

bp – bazių pora

C-galas – baltymo grandinės karboksi-galas

CPW – protoplastų plovimo tirpalas (ang. *cell and protoplast washing solution*)

CTAB – heksadeciltrimetilamonio bromidas

dH₂O – dejonizuotas vanduo

DNR – deoksiribonukleo rūgštis

E. coli – *Escherichia coli* bakterija

EM – ekstraląstelinis matriksas

FDA – fluoresceino diacetatas

g – gravitacinė jėga

GFP – žaliai fluorescuojantis baltymas (ang. *green fluorescent protein*)

IAR – indolil-3-acto rūgštis (fitohormonas auksinas)

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas

kbp – kilobazių pora

kDa – kilodaltonai

LB – lizogeninė terpė (ang. *Lysogeny broth*)

MKK – morkų kaliaus indukcijos terpė

MS – Murashige ir Skoog terpė

NAR – 1-naftalenoacetatinė rūgštis (fitohormonas auksinas)

N-galas – baltymo grandinės amino-galas

OD – optinis tankis (ang. *optical density*)

PEG – polietilenglikolis

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

RGD – tripeptidas iš arginino, glicino, aspartamo amino rūgščių (Arg-Gly-Asp)

RM – regeneracinė terpė (ang. *regeneration medium*)

SE – somatinė embriogenezė

SOC – optimali mitybinė terpė (ang. *Super Optimal broth with Catabolite repression*)

Ti-plazmidė – auglius sukianti plazmidė (ang. *tumor inducing plasmid*)

Tris-EDTA – buferis sudarytas iš tris(hidroksimetil)amino metano ir etilendaminotetraacto rūgšties

TSM – tabako suspensijos terpė (ang. *tobacco suspension medium*)

W5 – plovimo tirpalas

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopyranozidas

YEP – mielių ekstrakto peptono terpė (ang. *yeast extract peptone*)

YIGSR – pentapeptidas iš tirozino, izoleucino, glicino, serino, arginino amino rūgščių (Tir-Ile-Gly-Ser-Arg)

IVADAS

Medicinoje dirbtiniai organai ar audiniai vis dažniau naudojami patirtų traumų, degeneracinių ar susijusių su amžiumi ligų gydymui taip pat organų nepakankamumo atveju. Šiuo metu plačiai priimtas tokių atvejų gydymas yra organų transplantacija iš vieno individo kitam. Tam tikrais atvejais naudojami ir gyvūnų audiniai ar organai. Nepaisant to, kad šios procedūros išgelbsti daugybę gyvybių, tai nėra tobulas sprendimas. Transplantuojamas organas gali būti atmestas recipiento organizmo, o taip pat yra susiduriama su dideliu donorų stygiu. Dirbtinių organų ir audinių inžinerija išspręstų abi šias problemas [1].

Ši tarpdisciplininė sritis naudoja inžinerijos ir biomedicinos mokslų principus siekiant atstatyti, palaikyti ir pagerinti audinių funkcionalumą [1]. Svarbūs mokslo pasiekimai šioje sferoje yra atliekami nuolatos, jau dabar atradimai biomedžiagų, augimo faktorių, kamieninių ląstelių, biologinės mimikrijos ir kitose srityse sukūrė galimybes laboratorijoje užauginti organus naudojant dirbtinį ekstraląstelinį matriksą, ląsteles ir bioaktyvias molekules [2]. Tačiau ši nauja technologija nėra plačiai naudojama, nes vis dar susiduriama su tam tikrais sunkumais, iš kurių vienas svarbiausių yra organo dirbtinio karkaso (ang. *scaffold*) biologinis efektyvumas. Šis karkasas imituoja organų ir audinių natyviąją architektūrą ir aplinką bei dalyvauja audinių vystymosi procese [3]. Šiai funkcijai atlikti laboratorijose naudojamos įvairios ekstraląstelinio matrikso (EM) molekulės.

Fiziologinėje ląstelės mikroaplinkoje vyksta daugybė procesų, kuriuose dalyvauja EM skaidulos, tarpląstelinis skystis, gretimos ląstelės, bioaktyvūs junginiai. Ląstelių integrinai sąveikauja su adhezinėmis EM molekulėmis, tokiomis kaip fibronektinas, lamininas. Šie matrikso baltymai yra itin svarbūs siekiant ne tik struktūrų stabilumo, bet ir efektyviai ląstelių adhezijai, migracijai, augimui ir diferencijacijai [3-5].

Minėti ekstraląsteliniai baltymai yra didelės molekulinės masės struktūros, todėl jų gamyba naudojant plačiai taikomas bakterines raiškos sistemas yra problematiška. Alternatyva šiam metodui yra augalinės raiškos sistemos. Šiuo metu tokios raiškos sistemos pasižymi sąlyginai maža kaina, biologiniu saugumu, galimybe modifikuoti eukariotinius baltymus bei galima didesnio masto gamyba. Taip pat molekulių gamybai naudojami augalai ir vektoriai gali būti keičiami pagal esamus poreikius, tokios modifikacijos leidžia sukurti unikalius ir tolygius potransliacinius pokyčius žinduolių baltymuose [6, 7].

Vienas populiariausių modelinių augalų yra *Nicotiana tabacum*. *Nicotiana* genties augalai yra plačiai naudojami sudėtingų rekombinantinių baltymų raiškos tyrimuose jau kelis dešimtmečius.

Nepaisant kai kurių sunkumų baltymo gryninimo stadijose, jau net keli tokiu būdu pagaminti bioaktyvūs junginiai yra naudojami klinikiniuose tyrimuose [8].

Kaip alternatyva rekombinantinių baltymų raiškai tabako augaluose taip pat naudojamos valgomosios morkos, *Daucus carota* ssp. *sativus* [9]. Nors morkos baltymų raiškos tyrimuose naudojamos rečiau, tačiau būtent šie augalai gali palengvinti gamybos procesą, nes jos pasižymi lengvesne regeneracija po augalo transformacijos [10].

Šio projekto tikslas buvo įterpti chimerino peptido, imituojančio ekstraląstelinį matriksą, geną į augalinę raiškos sistemą.

Uždaviniai:

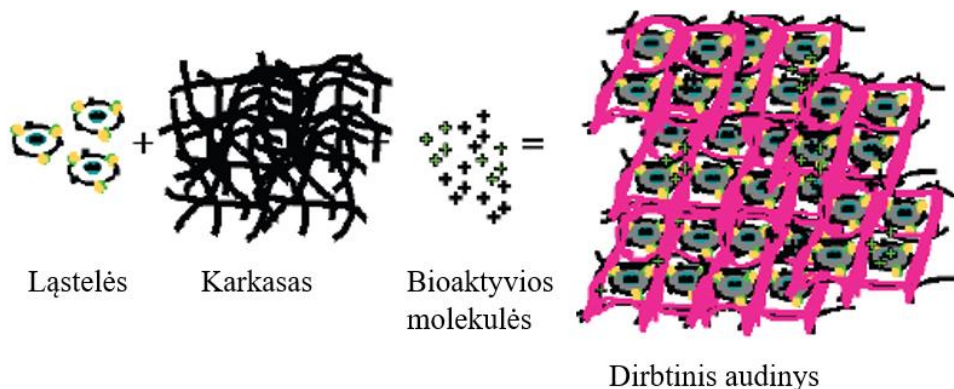
1. sukurti binarinės sistemos vektorių, nešantį chimerinio peptido geną;
2. sukurti *Agrobacterium tumefaciens* bakteriją, nešančią Ti-plazmidę su tiksliniu genu;
3. įterpti chimerinio peptido geną į *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota* augalines raiškos sistemas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Audinių inžinerija

Kai audiniai ar organai yra smarkiai pažeidžiami ligų, vėžio, įgimtos ydos ar traumos ir farmaciniai preparatai nebeįpadeda, yra atliekamos organų (audinių) transplantacijos. Organų transplantacija vykdoma donoro organą persodinant recipientui. Šiuo atveju yra susiduriama su galybe problemų, pradedant nuo tinkamų donorų trūkumo ir baigiant imuniniu organizmo atsaku į transplantatą. Paskutiniaisiais dešimtmečiais siekiant sukurti dirbtinius laboratorijose užaugintus organus iš pačio recipiento ląstelių atsiskyrė nauja mokslų sritis – audinių inžinerija. Pagrindinis audinių inžinerijos tikslas yra regeneruoti paties paciento organus ar audinius, taip siekiant išvengti autoimuninio atsako ir sukurti laboratorinį produktą, pasižymintį biofunkcionalumu bei biosuderinamumu su paciento organizmu.

Siekiant laboratorijoje užauginti naujus organus reikia trijų pagrindinių dalių: ląstelių, dirbtinio karkaso ir bioaktyvių molekulių (žr. 1.1. pav.). Medicinoje ne visuomet naudojamos visos šios trys dalys. Pavyzdžiui, kai kuriuose kaulinio audinio regeneraciniuose procesuose užtenka naudoti tik kaulo morfogeninį baltymą, o regeneruojant odą kai kuriais atvejais užtenka naudoti porėtą kolageninę plėvelę ant pažeistos vietos. Šiuo atveju nereikia nei papildomų ląstelių persėjimo, nei augimo faktorių. Iš aplinkinių sveikų audinių į kolageno poras atkeliauja nepažeisti fibroblastai ir čia išskiria baltymus ir glikozaminoglikanus, kurie sukonstruoja odos audinius, o kolageninė plėvelė tuo pačiu yra absorbuojama į kūną [11]. Minėtais atvejais dėmesys labiau kreipiamas į pagalbą organizmui regeneruotis pačiam, o ne į visiškai naujų struktūrų sukūrimą.



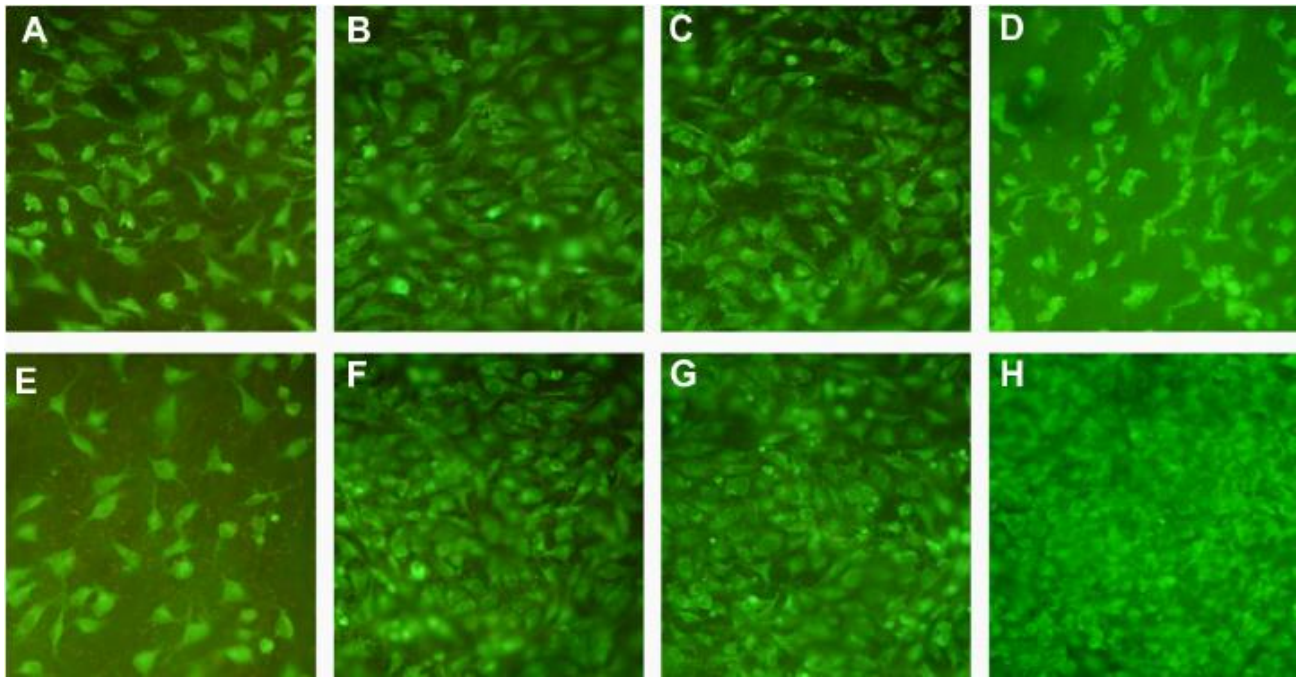
1.1. pav. Laboratorijoje užauginti dirbtiniai organai ar audiniai susideda iš trijų pagrindinių dalių: ląstelių, dirbtinio karkaso ir bioaktyvių molekulių (bioeng.nus.edu.sg/v3dev/research/Keyresearch/keysrh1.html).

Kitais atvejais, pavyzdžiui siekiant sukurti tridimensinį organą ar tiesiog audinius pasižyminčius sudėtingesne nei epitelinis monosluoksnis struktūra, tam kad naujos ląstelės turėtų prie ko prikibti ir tinkamai susiformuoti į pageidautiną organą, joms reikia tam tikro rėmo. Tokį vaidmenį atlieka dirbtinis organo karkasas. Nors yra atvejų kuomet specifinį degeneracinį sutrikimą galima paveikti ląstelių injekcija į pažeistą vietą, dauguma organų ar sudėtingų audinių reikalauja tam tikros atraminės struktūros siekiant užauginti funkcionalų produktą [11].

Dalis dirbtinių organų yra „užsėjami“ ląstelėmis *in vitro*, o dalis *in situ*. Abiejais šiais atvejais naudojamas iš anksto suformuotas arba injekuojamas dirbtinis EM, sukurtas iš bioaktyvių medžiagų gebančių sąveikauti su „užsėtomis“ ar endogeninėmis ląstelėmis bei organo karkasu. Dirbtinio organo konstruktai turi pasižymėti ir kitomis savybėmis: laidumu biomolekulėms, mechaniniu tinkamumu, stabilumu. Dirbtinis EM turi skatinti ląstelių augimą ir kitas natūralias jų funkcijas.

Nepaisant žymių pasiekimų audinių inžinerijoje vis dar nėra iki galo aišku kaip organizme sąveikauja biomedžiagos ir jų ląstelinė aplinka. Paskutiniu metu siekiant didesnio biosuderinamumo tarp dirbtinio organo ir organizmo plačiai pradėtos naudoti organų karkaso paviršiaus modifikacijos, t.y. dirbtinis karkasas yra padengiamas medžiagomis imituojančiomis EM. Vienos daugiausiai žadančių medžiagų dirbtinių karkasų gamyboje yra poliuretanai ir poliesteriai, tačiau jie pasižymi didžiuliu trūkumu. Kadangi jie abu yra sintetiniai junginiai, jie neturi jokių ląstelių atpažinimo vietų. Šiuo atveju paviršinės modifikacijos bioaktyviomis molekulėmis yra būtinos.

Tokiose situacijose specifinės bioaktyvios molekulės gali skatinti angiogenezę bei dirbtinių audinių įdiegimą [3]. Dažnai šios modifikacinės medžiagos padidina organo (audinio) funkcionalumą, skatindamos ląstelių adheziją, proliferaciją (žr. 1.2. pav.). Į dirbtinį karkasą galima įterpti vaistų molekules, peptidų sekas ar augimo faktorius. Peptidų sekos gali būti sudarytos iš ilgų organizmui natyvių baltyminių sekų ar trumpų fragmentų, skirtų tik ląstelėms atpažinti ir joms prijungti. Trumpos sekos tyrimuose yra populiareesnės nei ilgi fragmentai, mat jos nepasižymi savybe atsitiktinai susilankstyti taip sumažinant jų efektyvumą ir naudingumą [3]. Taip pat pastebėta, kad modifikacijos proceso metu trumpos sekos yra stabilesnės. Vienos populiariausių bioaktyvių medžiagų modifikacijoms yra kolagenas, fibronektinas, lamininas, elastinas, nefronektinas.



1.2. pav. A-D iliustracijose vaizduojamos endotelinės ląstelės ant nemodifikuoto karkaso paviršiaus po 1, 4, 7 ir 10 dienų inkubacijos atitinkamai, o E-H iliustracijose vaizduojamos ląstelės dengiančios heparinu ir dihidroksi-geležimi modifikuotą dirbtinį karkasą po po 1, 4, 7 ir 10 dienų inkubacijos atitinkamai [12].

1.2. Ekstraląstelinį matriksą imituojantis chimerinis peptidas

Šiame projekte buvo naudotas chimerinis peptidas, susidedantis iš natyviai aptinkamų ir modifikuotų laminino, fibronektino ir elastino fragmentų (žr. 1.3. pav.).

6xHis-Vdomenas-Bmod-YIGSR-RGD-Elastinas

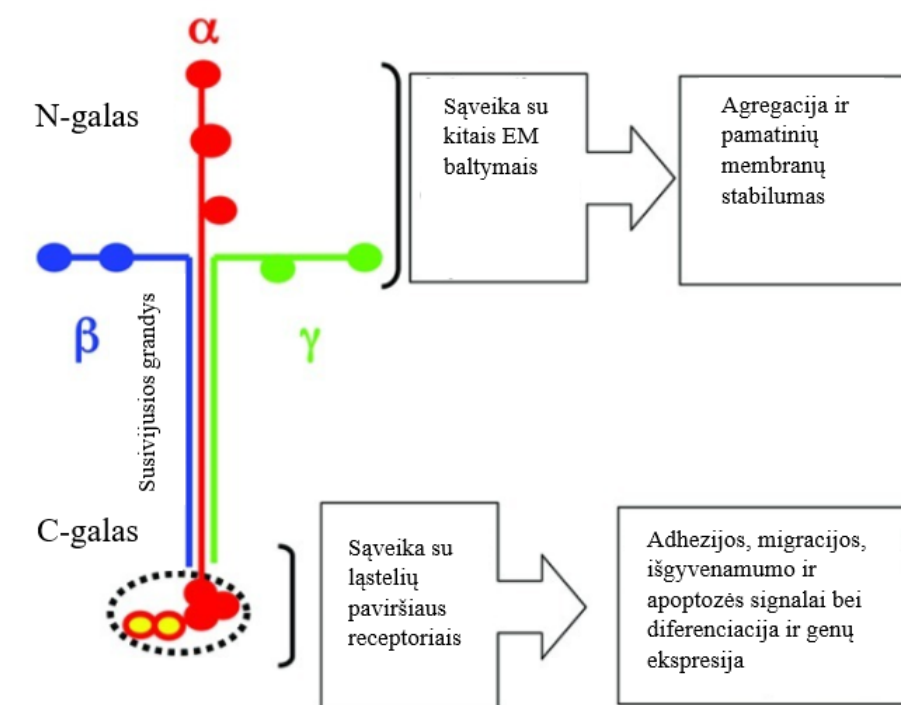
6 74 234 13 8 24 a.r.

1.3. pav. Projekte naudoto chimerinio peptido sandara: *6xHis* – histidino liekanų grandinė palengvinanti baltymo gryninimą, *Vdomenas* – V laminino domenas, *Bmod* – IV modifikuotas laminino domenas, *YIGSR* – laminino $\beta 1$ grandies fragmentas, *RGD* – fibronektino III tipo domeno fragmentas ir trumpas elastino fragmentas (Dr. Lee iliustracija).

1.2.1. Lamininas

Lamininų grupė susideda iš didelės molekulinės masės (~400 – ~900 kDa) glikoproteinų randamų EM. Itin daug jų aptinkama pamatinėje laminoje. Ši aptinkama daugumoje organų. Pamatinės laminos pagrindinė funkcija yra sukurti ant jos esančioms ląstelėms atramos/prisijungimo taškus [13]. Lamininai dalyvauja ląstelių diferenciacijos, migracijos ir adhezijos procesuose [3].

Lamininų šeima yra neatskiriama daugumos organų struktūros dalis. Šie peptidai yra heterotrimeriniai, susidedantys iš α , β ir γ grandinių sujungtų per disulfidinius tiltelius. Yra aptinkama po kelis kiekvienos grandies genetinius variantus. Trimerinis peptidas susikerta ir suformuoja asimetrišką kryžiaus formos darinį, kuris gali jungtis su ląstelių membranomis ar kitomis EM molekulėmis (žr. 1.4. pav.). Trys trumpesnės grandys itin gerai jungiasi su kitomis laminino molekulėmis taip suformuojant plėveles/pluoštus, o ilgoji grandis gali jungtis su kitomis plazminės membranos molekulėmis ar su ląstelėmis per intergrininius receptorių (žr. 1.5. pav.). Būtent per šias jungtis lamininai prisideda prie ląstelių prisijungimo, diferenciacijos, ląstelių formos ir judėjimo, audinių išgyvenamumo [13].



1.4. pav. Lamininų sandaros schema [13].

Kai kurios laminino funkcijos yra susietos su specifinėmis amino rūgščių (a. r.) sekomis ar fragmentais. Pavyzdžiui, a. r. seka GTFALRGDNGDNGQ, kuri yra aptinkama α grandyje, skatina endotelinų ląstelių adheziją. Tyrimų su kardiomiocitais metu pastebėta, kad auginant ląsteles ant laminino pluošto, dėl jo specifinės struktūros kardiomiocitai pradėjo augti paraleliai laminino molekulėms taip sudarydami darinius panašius į tuos aptinkamus *in vivo* [14]. Analogiškas tyrimas buvo atliktas dirbtiniam karkasui sukurti naudojant poliuretaną ir jo paviršių modifikavus laminino molekulėmis. Šio bandymo metu pavyko sukurti kardiomiocitų sistemą pasižyminčią natyvaus širdies audinio savybe susitraukinėti [15]. 2008 -aisiais metais dvi mokslininkų grupės nepriklausomai įrodė,

kad pelių embrioninės kamieninės ląstelės gali būti efektyviai auginamos ant rekombinantinio laminino sluoksnio [16, 17].

Laminino struktūroje aptinkami keli baltyminiai domenai pasižymintys konservatyviomis sekomis. Tyrimo metu chimerinio peptido struktūroje buvo naudotos laminino IV (B, LF/L4) domeno, V (LE) domeno ir trumpa $\beta 1$ (YIGSR) grandies sekos. Tyrimuose su iš pelių išskirtu lamininu [18], IV domenas buvo rastas tik $\beta 1$ ir $\beta 2$ grandyse. Jį sudarė 230 a. r. liekanų. Bandymo metu šis domenas buvo aptiktas pelių inkstų, raumenų ir kitų audinių pamatinėse membranose. Laminino struktūroje domenas IV aptinkamas trumposiose grandyse. Kaip jau minėta, šios grandys atsakingos už molekulės sąveiką su kitais EM junginiais. Šiose srityse yra daugiau rūšinių skirtumų nei ilgojoje grandyje. Manoma, kad taip yra dėl trumpųjų grandžių individualaus susilankstymo, mat joms gretimos grandys nedaro tokios didelės įtakos kaip ilgajai grandžiai. Domenas V daro įtaką epiderminių ląstelių augimui. Šis domenas yra mažesnis nei IV, jį natūraliai sudaro 41-70 a. r. liekanų. Laminino struktūroje šie domenai aptinkami vienas šalia kito [13].

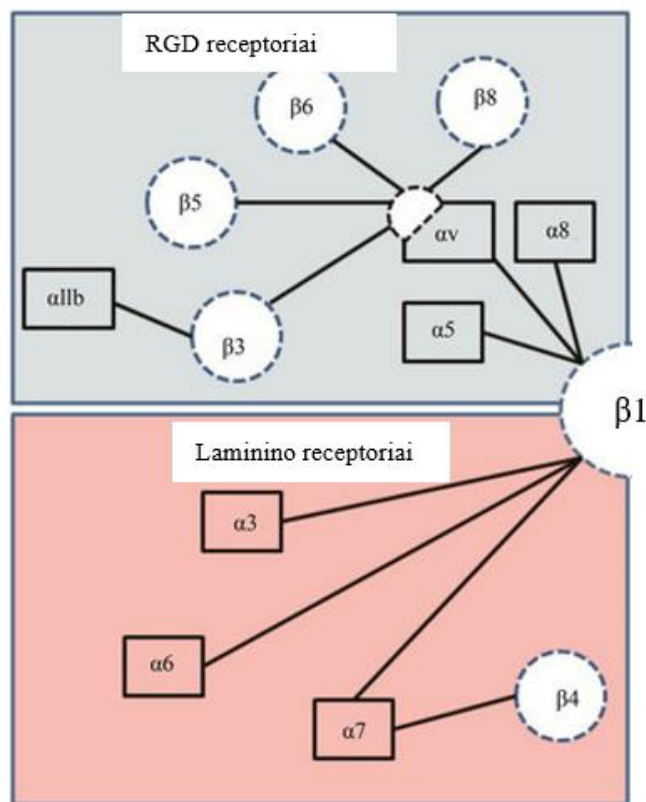
YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) seka aptinkama laminino $\beta 1$ grandyje. Ši seka yra žinoma kaip svarbi receptorių prisijungimo vieta. 2005 -aisiais metais išleistame straipsnyje teigima, jog ši seka intensyviai dalyvauja adhezijos procesuose. Tyrimo metu nustatyta, kad šis fragmentas pasižymi tokiomis pat adhezinėmis sąvybėmis kaip ir visas laminino baltymas, tačiau tyrime taip pat nurodyta, kad naudojant tik YIGSR fragmentą kardiomiocitai nesugebėjo susiformuoti į pilną sarkomerą [19].

1.2.2. Fibronektinas

Fibronektinas yra didelės molekulinės masės EM aptinkamas glikoproteinas, itin svarbus ląstelių adhezijos, migracijos ir išplitimo procesuose [3]. Tyrimuose su kardiomiocitais buvo įrodyta, kad fibronektinas yra efektyvesnis ląstelių adhezijoje ir proliferacijoje nei kolagenas I, želatina ir lamininas [20]. Fibronektinui būdingas didelis funkcionalumas – jis sąveikauja su daugiau nei puse žinomų integrininių receptorių [21]. Šis peptidas yra dimerinės struktūros. Du monomerai yra beveik identiški ir susijungia per disulfidinius tiltelius. Fibronektino monomerai turi tris modulius (I, II, III). III tipo domeno struktūra yra laisvesnė nei kitų dviejų, nes neturi vidugrandininių disulfidinių jungčių. Būtent šiame domene ir aptinkama RGD (Arg-Gly-Asp) seka. Dėl savo konformacijos ji dar vadinama RGD kilpa.

RGD kilpa yra trijų a. r. seka – tai viena iš pagrindinių sričių, per kurią surišamos ląstelės (žr. 1.5. pav.). Yra atlikta nemažai tyrimų, įrodančių jog ši seka yra itin efektyvi įvairių ląstelių adhezijai [22]. Sąryšyje su intergriniais, RGD seka yra bene svarbiausia, kadangi viduląstelinis citoskeletas su EM yra susietas intergrinų ir RGD sąveikos. Nustatyta, jog būtent ši seka suteikia fibronektinui

galimybę prisijungti daugiau nei dešimt integrinų [23] kai kiti panašaus tipo baltymai dažniausiai gali prisijungti tik kelis.

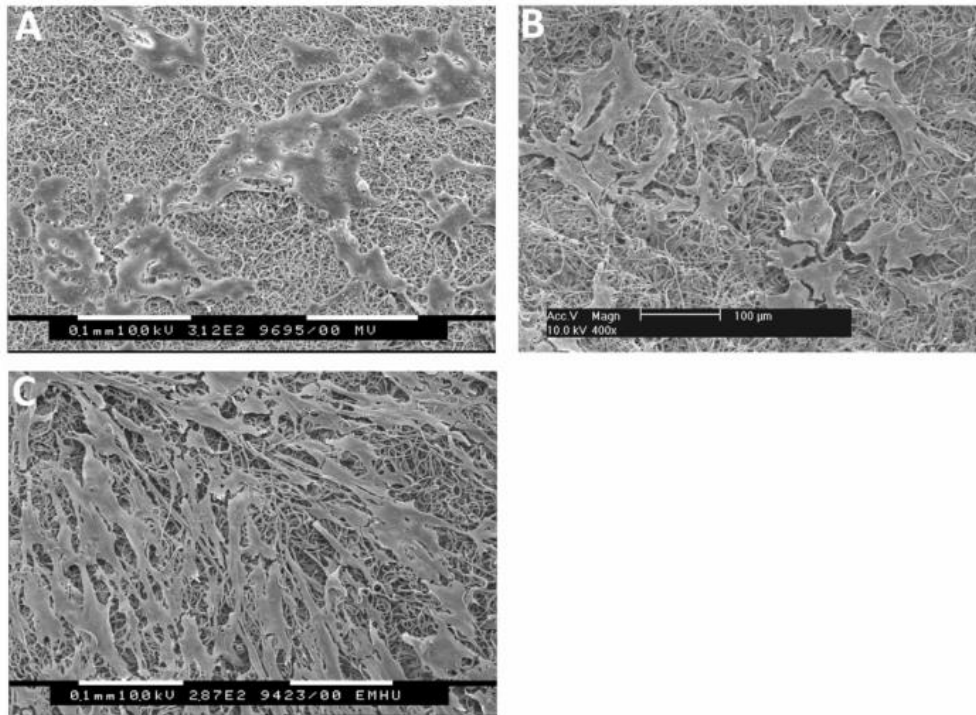


1.5. pav. Schemoje nurodyta su kuriais integriniais sąveikauja RGD seka ir lamininas [24].

Kaip ir anksčiau minėta laminino YIGSR seka, RGD gali dalinai atlikti fibronektino kaip adhezinio baltymo funkciją. Ją naudojant vietoj fibronektino, baltyminis konstruktas yra neapsunkinamas ilgomis sekomis [19]. Tyrimuose su sintetiniais karkasais buvo įrodyta, kad jų paviršių modifikavus RGD fragmentais, karkasų adhezinės funkcijos pasižymėjo analogiškais rezultatais lyginant su pilnos sekos fibronektinu [25]. Tačiau, nors RGD sekos efektyvumas yra nepaneigiamas, ji neatlieka visų fibronektinui būdingų funkcijų ir tam tikrais atvejais jos naudojimas nėra optimalus. Lyginamajame tyrime kolagenas I, lamininas ir RGD seka buvo prijungti prie hidrogelių. Buvo tiriamas modifikuotų hidrogelių atsakas į mioblastus ir embrioninius žiurkių miocitus. Eksperimente su miocitais, kai buvo naudotas hidrogelis padengtas RGD sekomis, buvo pastebėta ląstelių agregacija ir neorganizuota ląstelinė architektūra. Tyrėjai padarė išvadą, kad RGD nesuteikia adekvačių signalų šioms ląstelėms teisingai proliferuoti imituojant funkcionalų raumens audinį [26].

1.2.3. Elastinas

Biomedžiagos pagamintos naudojant elastiną yra vis plačiau tyrinėjamos siekiant jų pritaikymo audinių inžinerijoje (žr. 1.6. pav.). Tam įtakos turi labai palankios šio struktūrinio baltymo savybės: elastiškumas, savarankiškas agregavimasis (savi-organizacija), ilgalaikis stabilumas ir bioaktyvumas [5].



1.6. pav. Ląstelės auginamos ant sintetinio elastino pluošto. A – žmogaus bambagyslės venos endotelinės ląstelės, B – lygiųjų raumenų ląstelės, C – odos fibroblastai [27].

Elastinas yra vienas iš pagrindinių komponentų organuose, kuriems būdingas tamprumas, t.y. arterijos, plaučiai, šlapimo pūslė, oda, raiščiai, kremzlės [28]. Organizme aptinkamas elastiškas pluoštas yra sudarytas iš 90 % elastino, o kitą dalį sudaro mikrofibrilės. Šis EM baltymas atlieka jungiamojo pluošto funkciją kaip ir kolagenas.

Žmogaus tropoelastinas yra tirpi ~72 kDa dydžio molekulė. Tropoelastinas tai elastino prekursorius, gebantis sąveikauti su elastino-laminino receptoriais ląstelių paviršiuje bei kitais integriniais. Elastino degradacijos produktai taip pat pasižymi šia savybe. Ši sąveika svarbi elastino sintezėje, chemotaksio ir kraujagyslių kalcifikacijos inhibiciniame procesuose, fibroblastų proliferacijoje, įvairių rūšių ląstelių migracijoje ir diferenciacijoje, bei tam tikrų baltymų aktyvumui [5]. Tropoelastino tarprūšinis panašumas siekia net 70 %.

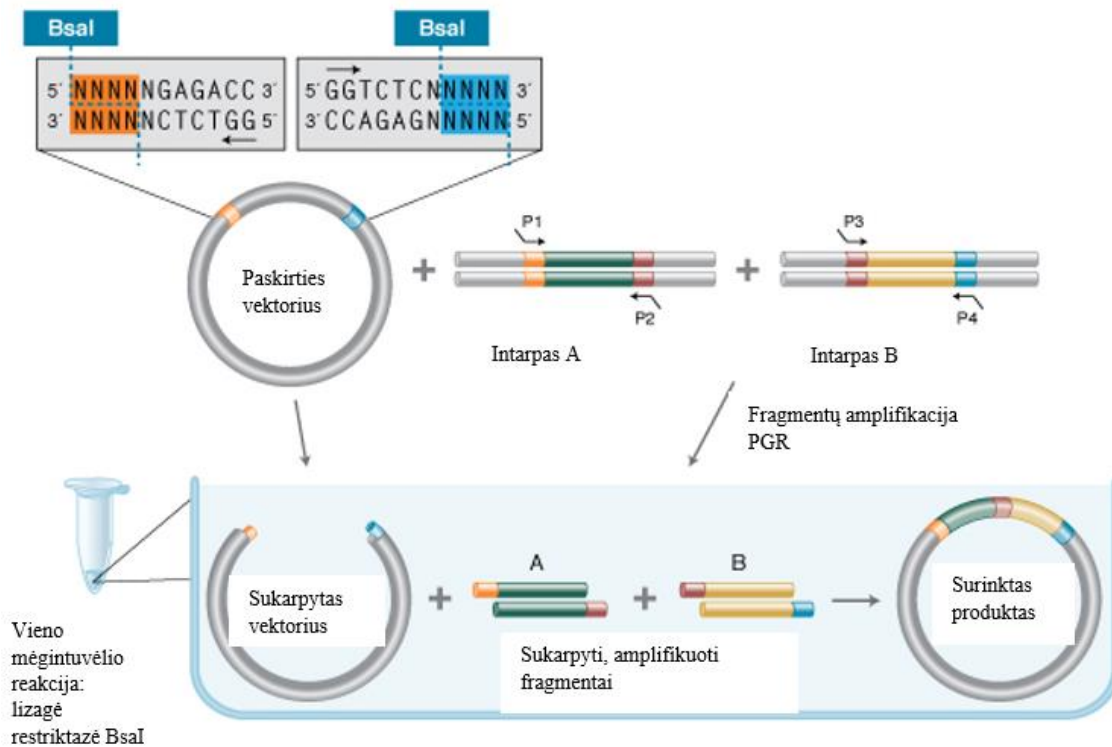
Audinių inžinerijoje elastinas dažnai naudojamas kartu su kolagenu siekiant suformuoti tridimensinius dirbtinius karkasus. Darant eksperimentus su kiškio ausų žaizdomis buvo pastebėta, kad naudojant alginato plėvelę modifikuotą elastino-laminino peptidu, žaizdos gijo greičiau nei kontrolės atveju [29]. Elastinas dažnai naudojamas tyrimuose su kraujagyslėmis. Kadangi jis natūraliai aptinkamas ten dideliais kiekiais (~30 %), šis baltymas naudojamas kuriant dirbtines kraujagysles ar dirbant su transplantais. Šiais ir analogiškais atvejais elastinas dažniausiai naudojamas kaip struktūrinis elementas [5, 28].

1.3. Rekombinantinių augalų gamybos augaluose metodologija

1.3.1. „GoldenBraid“ daugianario surinkimo reakcija

Šiais laikais biotechnologijoje ir sintetinėje biologijoje kuriamos vis sudėtingesnės genetinės konstrukcijos. Taikant šiuo metu plačiausiai naudojamas rekombinantinės DNR surinkimo technologijas, tokias konstrukcijas sukurti trunka ilgai ir yra sąlyginai sudėtinga. Ilgos DNR sekos gali būti sintetinės laboratorijose naudojant individualius nukleotidus kaip statybinius blokus. Nors metodas yra nuolat tobulėjantis ir vis rentabilėsnis, kuriant itin ilgas sekas jo kaina didėja, o procesas sudėtingėja. Taip pat svarbu paminėti, kad tiesioginė sintezė nevisada optimali siekiant kombinacinių sekos išdėstymų.

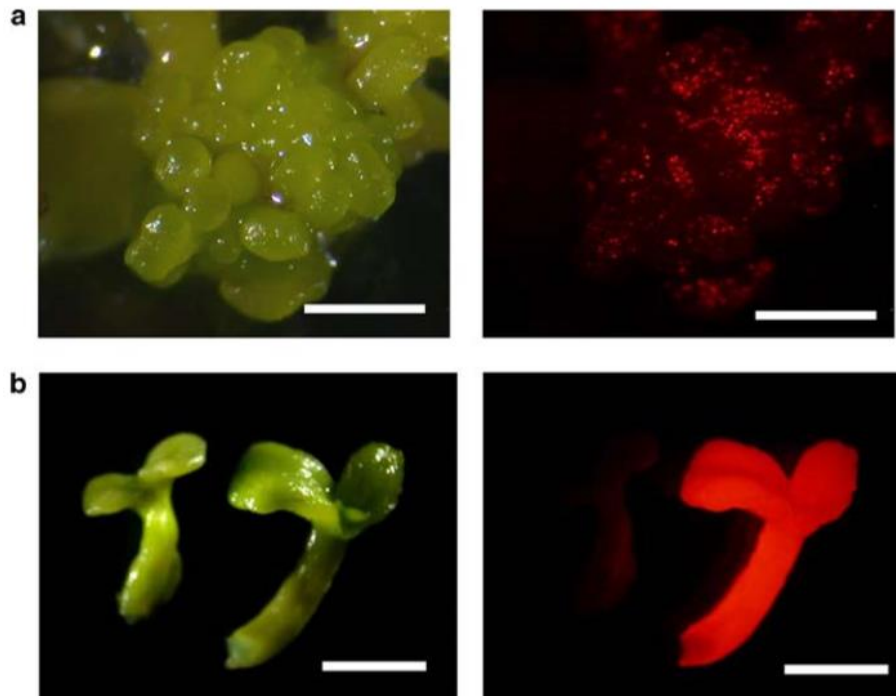
Alternatyva tiesioginei sintezei yra konstrukcija iš modulių arba daugianario surinkimo reakcija. Jos metu iš anksčiau sukurtų standartinių modulių sukuriama naujos sekos. Šis metodas pasižymi greitumu, įvairiapusiškumu, kombinatorikos galimybe tarp dirbtinių ir natūralių sekų ir dažnai mažesne kaina nei įprasti metodai. „GoldenBraid“ metodas yra specifiskai sukurtas naudoti sintetinėje augalų biologijoje ir metabolinėje inžinerijoje ir yra grindžiamas „GoldenGate“ klonavimo technologija. Šios technologijos pagrindinis privalumas yra itin efektyvus daugelio DNR fragmentų surinkimas vienos reakcijos metu (žr. 1.7. pav.) [30]. Procesas vykdomas *in vitro*, reakcijoje naudojama IIS tipo restriktazė ir T4 DNR ligazė. Technologija naudojasi specifine IIS tipo restrikcinių fermentų savybe seką kirpti ne savo atpažinimo vietoje. DNR seka nukerpama su lipniais galais (ang. *overhang*). Tai leidžia tolimesniame procese suliguoti du DNR galus be jokios žymės. Reakcija vyksta tarp restriktazės, ligazės, vektoriaus ir statybinių DNR blokų [31] viename inde termocikleryje (temperatūra nuo 16 °C iki 37 °C). Restriktazė sukuria 4 nukleotidų ilgio išsikišimą, kurią ligazė sujungs su kita pageidaujama seka.



1.7. pav. Principinė „GoldenBraid“ reakcijos schema (neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/golden-gate-assembly).

1.3.2. Augalų transformacija

Augalų transformacija – tai svetimoms augalams DNR pernaša į ląstelę ir įterpimas į augalo genomą. Svetimos genetinės medžiagos raiška augale gali būti trumpalaikė ir ilgalaikė (žr. 1.8. pav.). Trumpalaikė raiška, trunka kelias dienas ar ilgiau. Svarbu paminėti, kad tokie augalai neperduoda transgeninės DNR savo palikuonims. Šis būdas dažnai taikomas naujų transformacijos metodologijų bei metabolikos tyrimuose. Ilgalaikė raiška pasižymi gebėjimu perduoti transgeninę DNR savo palikuonims, tačiau tai ilgas ir sudėtingas procesas lyginant su trumpalaikės raiška. Ilgalaikės raiškos atveju svarbu yra sėkmingai regeneruoti augalus iš paveiktų ląstelių ar audinių eksplantų [32].



1.8. pav. Stebima trumpalaikė raudonos spalvos fluorescavimą koduojančio geno raiška po 24h inkubacijos (a) ir ilgalaikė to paties geno raiška po 25 dienų inkubacijos transformuotuose sojų pupelių somatiniuose embrionuose. Šalia palyginimui pateiktos nuotraukos natūralioje šviesoje [33].

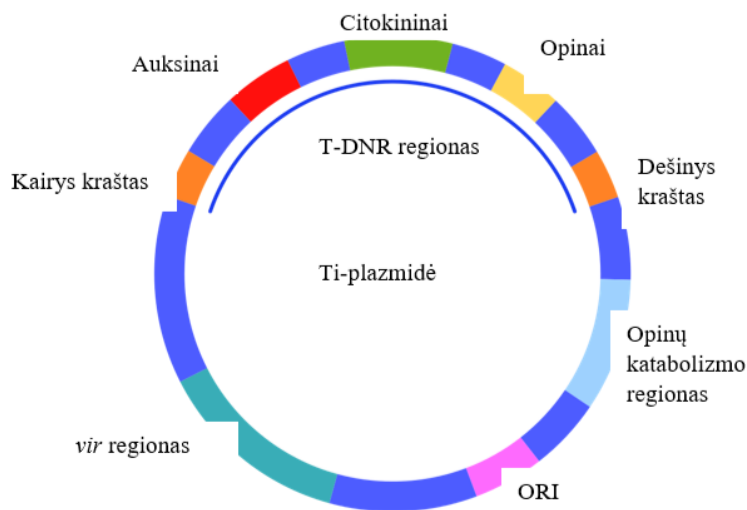
Augalų transformacijos technologija sukurta 7 -tajame praecito amžiaus dešimtmetyje ir prasidėjo nuo tyrimų su agrobakterijomis. Nuo to laiko buvo sukurta ar pritaikyta daug naujų genetinės medžiagos pernašos į augalus metodų. Šiuo metu populiariausi metodai yra transformacija agrobakterijomis, biolistika (biologinių dalelių balistika) ir elektroporacija. Kartais siekiant efektyvesnės transformacijos naudojami keli metodai. Daugiausia dėmesio tyrimuose skiriama augalų transformacijai *Agrobacterium tumefaciens* bakterijomis – tai labai efektyvus, sąlyginai nesudėtingas ir rentabilus transformacijos metodas.

Dabar plačiai vystomas augalų molekulinis ūkininkavimas (ang. *plant molecular farming*). Ši technologija praktikuoja masinį augalų panaudojimą specifiniams terapiniams žmogaus peptidams išgauti. Nemažai tokių baltymų jau vartojami klinikiniuose bandymuose ir yra netoli plataus masto gamybos. Augalai gali būti naudojami pagaminti farmacinius junginius pigiau ir efektyviau nei kitais metodais. Transgeninio tabako augalo išskirti antikūniai buvo naudojami paskutinio ebolos protrūkio metu Afrikoje. 2015 -aisiais metais klinikiniai tyrimai buvo atliekami su transgeninio tabako išskirtomis maliarijos, paukčių gripo ir ŽIV vakcinų sudėtinėmis dalimis. Analogiškas metodas buvo vartotas gydant vitamino B12 nepakankamumą tik vietoj tabako buvo naudotas vairėnis (*Arabidopsis thaliana*) [7].

1.3.2.1. Augalų transformacija naudojant *Agrobacterium tumefaciens* bakterijas

A. tumefaciens yra dirvožemyje aptinkama, lazdelinė, gram-neigiama bakterija. Ji daliai augalų sukelia gumbelines šaknų ligas. Ši patogeninė bakterija sugeba į augalo genomą įterpti savo genus ir tokiu būdu indukuoti augalo augimo hormonų gamybą (dėl jų sukeltos ląstelių proliferacijos susidaro gumbai) bei augalui nebūdingų metabolitų sintezę. Augalas pradeda gaminti opinus (amino rūgščių darinius) ir agropinus (cukrų darinius). Šie naudojami kaip bakterijos energijos ir anglies šaltiniai.

Agrobakterijos yra pritraukiamos į pažeistas augalo vietas chemotaksio būdu. Genų pernašai itin svabi yra agrobakterijų plazmidė – Ti-plazmidė (ang. *tumor inducing plasmid*). Joje aptinkamas T-DNR (ang. *transfer DNA*) regionas, kuriame yra opinų biosintezę ir augalų augimo hormonų produkciją koduojančios sekos. Šios sekos šiek tiek skiriasi tarp skirtingų kamienų, tačiau turi kelis esminius bendrus bruožus: vieną ar daugiau T-DNR regionų, *vir* (virulentiškumo) regioną, opinų katabolizmo genus, regioną atsakingą už konjugacinę pernašą, ORI (ang. *origin of replication*) regioną (žr. 1.9. pav.). Svarbiausi augalų transformacijoje yra T-DNR ir *vir* regionai.



1.9. pav. Gamtoje aptinkamų agrobakterijų Ti-plazmidės principinė struktūrinė schema
(en.wikipedia.org/wiki/Ti_plasmid).

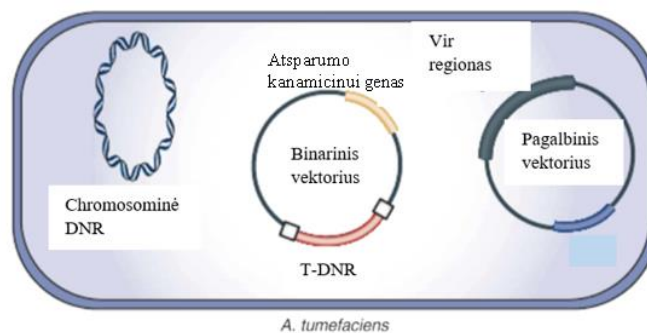
T-DNR pernašos ir integracijos procesas gamtoje vyksta taip:

- pažeisti augalai išskiria cukrus ir fenolinius junginius, naudojamus lignino ir antimikrobinių junginių sintezėje. Šiuos pokyčius agrobakterijos atpažįsta ir jų ląstelės yra nukreipiamos į pažaidos vietą;
- bakterija prisikabina prie augalo ląstelių. Iš pradžių tai padaroma naudojant polisacharidus, o vėliau išskiriamas celiuliozinis pluoštas;

- indukuojami virulentiškumo genai;
- bakterijoje pradedama T-DNR produkcija. Tame dalyvauja vir baltymų kompleksas;
- T-DNR yra transportuojama iš bakterijos į augalo ląstelę per konjugacinį tiltelį. Šiame procese taip pat dalyvauja *vir* genai;
- T-DNR pernešama į augalo ląstelę ir integruojama į augalo genomą. Citoplazmoje T-DNR yra apsupama specifinių vir baltymų, apsaugai nuo augalo nukleazių. Šis kompleksas patenka į branduolį per jo poras, o po to vir baltymai yra atjungiami ir degraduojami. Atkuriamą dvigrandė T-DNR, ji įterpiama į augalo genomą, kaip manoma per DNR pažaidos mechanizmus.

Svarbu paminėti, jog agrobakterijos yra vieninteliai žinomi prokariotai gebantys pernešti DNR į eukariotines ląsteles. Šis metodas turi daug pranašumų lyginant su kitais transformacijos būdais [34]. Jo metu gali būti pernešami gan dideli DNR segmentai. Taip pernešus genetinę informaciją, nustatyta mažesnė tikimybė jos praradimui vykstant genetiniui persitvarkymui [35].

Laboratorinėje augalų transformacijoje labai svarbu yra tinkamas vektorius. Natūraliomis sąlygomis Ti-plazmidė yra daugiau nei 190 kbp ilgio, todėl kaip vektorius ji yra per didelė. Siekiant metodą optimizuoti buvo sukurta binarinė vektorių sistema. Iš gamtoje aptinkamų Ti-plazmidės variantų ji išsiskiria tuo, jog T-DNR ir virulentiškumo genai yra aptinkami ant dviejų skirtingų plazmidžių (žr. 1.10. pav.). Vienas iš binarinės sistemos vektorių gali replikuotis ir agrobakterijose ir *E. coli* [35]. Transformacijos metu dirbama tik su plazmide turinčia T-DNR (ji dažnai ir vadinama binariniu vektoriumi).



1.10. pav. Agrobakterijų binarinės vektorių sistemos schema [36].

Augalų transformacija naudojant agrobakterijas yra plačiai naudojamas metodas. *A. tumefaciens* gali transformuoti daugelį dviskilčių augalų (rožės, chrizantemos, obelys, persikai ir kt.) bei kelias vienaskilčių rūšis [37]. Dar 1986 -aisiais metais šis būdas buvo naudotas siekiant išskirti žmogaus

chimerinį augimo hormoną iš tabako ir saulėgražos [38]. 2015 -aisiais transgeniniai tabako augalai transformuoti agrobakterijomis buvo naudoti kuriant ŽIV antikūnius [39].

1.3.2.2. Protoplastų transformacija

Augalo protoplastai – tai augalo ląstelės, kurioms naudojant fermentus yra pašalinama sienelė. Ląstelės suapvalėja bei tampa lengvai paveikiamos ir pažeidžiamos, nes yra praradę savo struktūrinę ir apsauginę funkciją atliekantį barjerą. Iš augalo ląstelių išskyrus protoplastus, šiuos galima daug lengviau transformuoti. Proplastai dažniausiai išskiriami iš lapo mezofilinio audinio.

Protoplastų transformacija pasižymi gan dideliu efektyvumu ir didele ilgalaikės raiškos tikimybe regeneravus augalui. Į protoplastus įterpus fluoresuojančius ar analogišką funkciją atliekančius baltymus koduojančią DNR, galima greitai ir nesunkiai atlikti transgeninių augalų atranką. Protoplastams būdinga ir trumpalaikė raiška. Tai ne tik puikus būdas tyrinėti baltymų raišką augaluose bet ir kai kurių mokslininkų nuomone tokią raiškos sistemą galima pritaikyti pramoninėje gamyboje [40].

Dėl unikalios protoplasto struktūros, juos galima transformuoti naudojant polietilenglikolį (PEG), agrobakterijas ar elektroporaciją. Protoplastų transformacijos metodas pagrįstas augalų regeneracija iš ląstelių - somatine embriogeneze (SE).

Vairenio lapų ir šaknų protoplastai jau seniai naudojami transgeniniams augalams kurti. Minimame bandyme tam buvo naudotas PEG. Anot autorių, lapų protoplastai pasižymėjo sąlyginai maža transgeno raiška palyginus su ląstelių suspensija. Jų nuomone ląstelių suspensija puikiai tinka siekiant trumpalaikės raiškos, kadangi ląstelės suspensijoje greitai dauginasi ir introdukuoti genai pasireiškia taip pat greitai [41]. Dar 1981 -aisiais buvo atliktas bandymas, kurio metu tabako protoplastai buvo transformuoti naudojant agrobakterijas. Tyrėjai atkreipė dėmesį, kad tokiu būdu pasiekiamas didelis efektyvumas ir geras duomenų atkartojamumas [42].

Elektroporacija yra itin plačiai pritaikomas genetinės medžiagos pernašos metodas. Tyrime atliktame naudojant apelsino protoplastus transformacijai buvo panaudoti GFP (ang. *green fluorescent protein*) genai. Šešios valandos po eksperimento jau buvo stebima trumpalaikė baltymo raiška, kurios intensyvumas paros bėgyje didėjo. Tačiau šio eksperimento metu nebuvo pasiekta ilgalaikė raiška [43].

Tiek elektroporacijos, tiek PEG metodai pasižymi bendru trūkumu. Šiais atvejais kitaip nei dirbant su agrobakterijomis sunkiau pasiekti ilgalaikę baltymo raišką. Taip pat svarbu paminėti, kad protoplastų transformacijai būdinga sąlyginai sunki ir ilgai trunkanti augalo regeneracija.

1.3.2.3. Lapo disko transformacija

Lapo diskas – tai nedidelis augalo lapo audinių mėginys. Tam tikrais atvejais eksperimentui nuo jo gali būti pašalinamas epitelinis sluoksnis. Nesteriliomis sąlygomis auginti augalų lapai gali būti sterilizuojami chemikalais.

Lapo disko transformacija yra sąlyginai nesudėtingas ir efektyvus metodas plačiai taikomas laboratorijose. Šiai transformacijos rūšiai naudojamos agrobakterijos. Nors metodas plačiausiai naudojamas tabakui, jis tinkamas ir kitiems augalams [44, 45]. Metodas, kaip ir protoplastų transformacija, yra pagrįstas SE. Augalams būdinga savybė regeneruoti naujus individus ne vien iš savo gametų. Kadangi somatiniai embrionai generuojami be apvaisinimo, jie yra identiškai savo motininiam augalams, t.y. klonai. SE skirstoma į du tipus: tiesioginę ir netiesioginę. Netiesioginės SE metu naujas augalas regeneruojasi iš transgeninių ląstelių susiformavusio kaliaus (neorganizuotas ląstelių agregatas), o antruoju atveju kaliaus stadija yra praleidžiama ir naujas augalas regeneruojamas tiesiai iš transgeninio augalo organizuoto audinio. Lapo disko transformacija gali būti naudojama ne tik transformacijos tyrimuose, bet ir tiriant molekulinis, morfogenetinius ir reguliacinius augalo procesus [46].

Pagrindinis lapo disko transformacijos privalumas – greitesnė eksplanto regeneracija nei pavyzdžiui dirbant su protoplastais. Taip yra dėl tiesioginės SE. Taip pat šis metodas yra sąlyginai lengvesnis nei protoplastų transformacija.

1.3.2.4. Ląstelių suspensijos transformacija

Augalo ląstelių suspensija – tai sterili augalo ląstelių kultūra paruošta iš kaliaus ir auginama skystoje mitybinėje terpėje. Augalo ląstelių suspensinės kultūros yra plačiai naudojamos augalų biologijos tyrimuose. Tyrėjai išvengia darbo su visu augalu ir susikoncentruoja tik ties jų ląstelėmis. Tokiai ląstelių kultūrai būdingas homogeniškumas, didelis žaliavos prieinamumas, greita ląstelių proliferacija. Tokios savybės leidžia suspensijas naudoti fiziologinių procesų tyrimuose ląsteliniam ir molekuliniam lygmenyse [47]. Jas taip pat galima naudoti antrinių metabolitų sintezėje komerciniam panaudojimui [48].

Augalų ląstelių suspensijos naudojamos ir transformacijai. Dažniausiai tam naudojamos agrobakterijos. 1997 -aisiais mokslininkų grupė panaudojo vairo ląstelių suspensiją ir integravo jonvabalio liuciferazės geną. Tyrimo metu buvo pasiekta ilgalaikė raiška [49]. Metais vėliau išleistame straipsnyje aprašoma miežių ląstelių suspensijos transformacija agrobakterijomis. Jos metu

buvo įterptas atsparumo genas, kuris buvo rastas regeneruotuose kaliuose naudojant *Southern Blot* analizę. Susiformavusiems kaliams buvo būdinga ilgalaikė baltymo raiška [34].

Augalų suspensinės kultūros pasižymi keliais esminiais privalumais, kurie padaro jas itin tinkamas rekombinantinių baltymų gamybai. Jos gali būti kultivuojamos aseptinėmis sąlygomis naudojant standartines fermentacijos technologijas, metodą nesudėtinga pritaikyti masinei produkcijai. Tokio tipo gamyba reglamentuojama analogiškai jau esamoms mikrobinėms ir žinduolių ląstelių sistemoms [50].

1.3.2.5. Hipokotilių transformacija

Augalo hipokotiliai – tai jų daigų stiebeliai tarp pirmųjų lapelių ir šaknies. Hipokotilis yra viena iš augalo dalių, kuri dažnai naudojama kuriant transgeninius individus. Jų transformacija yra efektyvi ir sąlyginai nesudėtinga. Hipokotilių transformacijos metodas sėkmingai taikomas daugeliui augalų rūšių (bastutiniai, agurkas, slyva, eukaliptas, kivis, baklažanas) [51].

Dar 1989 –aisiais metais buvo išleista publikacija, aprašanti morkų hipokotilių transformaciją naudojant agrobakterijas. Transformantai buvo auginami ant selektyvios terpės su kanamicinu. Po 6 savaitių susiformavo kanamicinui atsparūs kaliai. Jie sudarė 5,8 % visų eksplantų [81].

Sun ir kt. straipsnyje aprašomas autorių išvystytas efektyvus ir greitas pomidorų transformacijos agrobakterijomis metodas. Transformacijoje naudojami augalo hipokotiliai ir pirminiai lapeliai (ang. *cotyledons*). Tyrimo metu buvo optimizuota transformacijoje naudojama bakterijų koncentracija, inkubacijos su bakterijomis trukmė, fitohormonų koncentracijos terpėse [52].

Kitoje publikacijoje rašoma apie transgeninių rapsų veislių kūrimą. Straipsnyje minima, kad manipuluoti rapsų genetinė medžiaga yra sudėtinga, tad labai svarbu pasirinkti ne tik efektyvų transformacijos protokolą, bet ir tinkamą eksplanto tipą. Tyrimo metu buvo siekta optimizuoti transformacijos protokolą, tad buvo atlikta nemažai metodo modifikacijų. Nustatyta, kad optimaliausia naudoti hipokotilius, išpjautus iš aštuonias dienas augintų daigų. Taip pat buvo nustatytos optimalios bakterijų koncentracijos bei kokultivavimo su agrobakterijomis trukmė [53].

1.4. Baltymų raiškos sistemos augaluose

Rekombinantiniai baltymai plačiai naudojami medicinoje, pramonėje ir moksliniams tyrimams. Dažnai taikomos žinduolių ląstelių kultūros raiškos sistemos tampa per brangios ir ieškoma naujų, saugių ir rentabilių metodų įvairiems rekombinantiniams baltymams išgauti. Svarbi yra ir galimybė

metodą pritaikyti masinėje gamyboje. Baltymų raiškos sistemos augaluose pasižymi daugeliu patrauklių privalumų, tad yra vis plačiau naudojamos (žr. 1.1. lentelė)

Nuo pirmųjų tyrimų, prieš kelis dešimtmečius, augalų raiškos sistemos pastebimai patobulėjo ir tabako raiškos sistema yra puiki alternatyva žinduolių ląstelių kultūroms [8].

1.1. lentelė. Skirtingų farmacinių rekombinantinių baltymų raiškos sistemų palyginimas [7].

	Transgeniniai augalai	Augalų ląstelių kultūros	Bakterijos	Mielės	Žinduolių ląstelių kultūros	Transgeniniai gyvūnai
Kaina	Labai žema	Vidutiniška	Žema	Vidutiniška	Aukšta	Aukšta
Gamybos pajėgumų didinimas	Labai didelis	Vidutiniškas	Didelis	Didelis	Labai mažas	Mažas
Gaminimo mastai	Globalūs	Riboti	Riboti	Riboti	Riboti	Riboti
Baltymų išeiga	Didelė	Didelė	Maža	Didelė	Vidutiniškai aukšta	Didelė
Baltymų konformacijos tikslumas	Didelis	Didelis	Mažas	Vidutiniškas	Didelis	Didelis
Glikozilimas	Nedideli skirtumai	Nedideli skirtumai	Nėra	Netinkamas	Tinkamas	Tinkamas
Produkto kokybė	Aukšta	Aukšta	Žema	Vidutiniška	Aukšta	Aukšta
Galimi užkratai/užkrato tikimybė	Žema	Žema	Endotoksinai	Žema	Virusai, prionai, onkogeninė DNR	Virusai, prionai, onkogeninė DNR
Saugumas	Didelis	Nespecifinis	Mažas	Nežinoma	Vidutiniškas	Didelis
Sandeliavimo kaina	Žema	Vidutiniška	Vidutiniška	Vidutiniška	Aukšta	Aukšta

1.4.1. *Nicotiana tabacum* raiškos sistema

Nicotiana tabacum L. yra itin plačiai naudojamas modelinis organizmas. Tai yra daugiametis žolinis augalas, kuris auga tik kultivuota forma. Jį sąlyginai lengva apdulkinti, vegetacinis ciklas trunka 3-4 mėnesius. Vienas augalas gali generuoti itin daug sėklų ir priklausomai nuo prieinamų mitybinių medžiagų augalas gali generuoti daug biomasės. Tabakas gali užaugti iki 2,5 m aukščio, jo lapai gali būti iki 60 cm ilgio. Kadangi tabakas komerciškai naudojamas jau daug metų yra sukaupta

nemažai informacijos apie šį augalą. Taip pat verta paminėti, kad tabakas priklauso *Solanaceae* (bulvinių) šeimai, kuriai priklauso ir nemažai žemdirbystėje naudojamų rūšių.

Jau kelis dešimtmečius tabako baltymų raiškos sistema naudojama kuriant sudėtingus terapinius baltymus [46]. Grupė mokslininkų 2000 -aisiais metais į tabako chloroplastus, ilgalaikiai raiškai pasiekti, įterpė bioelastino polimero prekursorių genus. *Western Blot* analizės metu buvo patvirtinta sėkminga geno integracija. Šio tabako išskirtas polimeras gali būti naudojamas iraus bioplastiko gamyboje ar medicinoje [54]. 2015 -aisiais metais mokslininkų komanda biolistiniu metodu į tabako chloroplastus įterpė fibroblastų augimo faktoriaus geną. Po atliktos transgeninio tabako analizės buvo nustatyta, kad svetimasis peptidas sudarė 0,1 % visų transgeninio tabako lapuose aptiktų tirpių baltymų. Pasak autorių tai efektyvus būdas galimti transgeninius terapinius peptidus [55].

Kitame straipsnyje aprašomas transformuoto tabako chloroplastų sekretuojamas rekombinantinis žmogaus somatotropinas. Analizės metu nustatyta, kad rekombinantinis baltymas sudarė >7 % visų išskirtų tirpių baltymų ir buvo bioaktyvus [56].

Nors tokia terapinių baltymų gamyba susiduria ir su tam tikrais sunkumais (biosaugumas, brangus baltymo išskyrimas ir gryninimas [7]) mokslinė bendruomenė sutinka, jog tai puiki alternatyva šiuo metu plačiausiai naudojamam žinduolių ląstelių kultūrų metodui [56, 57].

1.4.2. *Daucus carota* raiškos sistema

Daucus carota L. yra salierinių (lot. *Apiaceae*) šeimos žolinis augalas, kurio kultivuoti porūšiai plačiai naudojami visame pasaulyje. Tyrimuose naudojama valgomoji morka (*Daucus carota* ssp. *sativus*). Augalas dvimetis, pirmaisiais metais intensyviai generuojama šakniavaisio biomasė, antraisiais metais intensyviai auga stiebai ir žiedynai. Šakniavaisis būna iki 30 cm ilgio ir gali sverti iki 200 g. Tai viena iš plačiausiai ir seniausiai auginamų daržovių.

Valgomoji morka yra naudojama kaip modelinis augalas tyrinėjant dviskilčių SE. Taip yra todėl, kad ši daržovė pasižymi sąlyginai nesudėtingu auginimu *in vitro* bei lengvesne regeneracija nei kai kurie kiti augalai. Dėl savo regeneracinių savybių morka buvo vienas pirmųjų augalų naudotų agrobakterijų transformacijoje. Ji taip pat plačiai taikoma ilgalaikės transformacijos tyrimuose. Nustatyta, kad iš morkos gan lengva išskirti protoplastus. Jos ląstelės efektyviai ir greitai atkuria pažeistą savo sienelę, taip pat transgeninės ląstelės baltymus ekspresuoja dideliais kiekiais [10].

Morkos baltymų raiškos sistema nėra taip intensyviai išvystyta kaip tabako, tačiau jau ne vienerius metus valgomoji morka plačiai naudojama vakcinoms kurti. 2009 -aisiais bandymo metu į morką buvo įterptas pasiutligės viruso genas naudotas vakcinoms. Analizės metu genas buvo rastas net 93,3 % suaugusio augalo šaknų [9]. Taip pat, kaip plačiai naudojamas valgomas augalas, morka

buvo pasirinkta kaip vakcinos nuo tymų nešiklis. Mokslininkų grupė sukūrė efektyvią valgomą vakciną, kuri eksperimento metu buvo išbandyta su pelėmis ir *in vitro* [58].

D. carota yra pirmasis augalas, komerciškai naudojamas biofarmacinių preparatų, skirtų žmonių vartojimui, gamyboje („Protalix Biotherapeutics“, Izraelis). Morka buvo naudota taliglucerezės-alfa gamyboje. Šis fermentas naudojamas kaip pakaitalas gydant Gošė ligą (ang. *Gaucher*). Tai itin svarbus proveržis biofarmacijos srityje [7].

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

Šis baigiamasis magistro projektas buvo atliktas Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filiale Sodininkystės ir daržininkystės institute (Kauno g. 30, Kauno r., Babtai 54333), Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriuje.

Visi mikroorganizmų ir augalų *in vitro* manipuliacijos procesai buvo atliekami steriliomis sąlygomis laminare (Telstar Bio II Advance, Ispanija). Terpių ir kitų tirpalų sudėtys ir koncentracijos nurodytos jų vandeniniam tirpalui, nebent šalia tirpalo specifiškai nurodyta kitaip. Visos terpės sterilinamos autoklavuojant +121 °C temperatūroje, esant 1 atmosferos slėgiui, 30 minučių. Antibiotikai į terpes dedami po autoklavavimo, terpes atvėsinus iki ~+50 °C. Fitohormonai taip pat, nebent prie specifinės terpės paminėta kitaip.

2.1. Chimerinis peptidas

Šiame baigiamajame magistro projekte buvo naudotas chimerinis peptidas gautas iš Dr. Chyan-Jang Lee iš Otavos ligoninės tyrimų instituto (ang. *Ottawa Hospital Research Institute, Kanada*). Peptidas šiuo metu yra naudojamas tyrimuose ir pageidaujant Dr. Lee jo nukleotidinė seka nėra viešai skelbtina.

Chimerinis peptidas yra EM imituojantis baltymas sudarytas iš fibronektino, laminino ir elastino fragmentų. Jo dydis yra 35,7 kDa, o izoelektrinis taškas – 5,21. Bendras ilgis 359 a. r., 1077 bp. Eilės tvarka peptidas susideda iš:

- 6 histidino a. r. gryninimui palengvinti;
- laminino V domeno 74 a. r. fragmento;
- laminino IV domeno 234 a. r. modifikuoto fragmento;
- 13 a. r. ilgio YIGSR sekos fragmento;
- 8 a. r. ilgio fibronektino RGD fragmento;
- 24 a. r. ilgio elastino fragmento.

2.2. Chimerinio peptido vektoriaus konstrukcijos kūrimas ir *E. coli* bakterijų transformacija

„GoldenBraid 3.0“ daugianario surinkimo reakcija buvo naudota siekiant sukonstruoti binarinės sistemos vektorių, nešantį chimerinio peptido seką. pDGB3_alpha1 vektorius, P35S promotoriaus ir T35S terminatoriaus moduliai įsigyti iš „Addgene“ plazmidžių kolekcijos (addgene.org). Modulių

pavadinimai atitinka pavadinimus pateiktus gamintojų tinklalapyje. Reakcija buvo atlikta pagal gamintojų siūlomus programinius parametrus.

1. Pirmiausia sudaromas reakcijos mišinys. Eilės tvarka į mikro-mėgintuvėlį dedama:
 - 4,5 µl dH₂O;
 - 0,9 µl promotoriaus (GB0030) (75 ng);
 - 0,7 µl chimerinio peptido (GB_UD_48C4) (75 ng);
 - 0,8 µl terminatoriaus (GB0036) (75 ng);
 - 0,6 µl binarinės sistemos vektoriaus (pDGB3_alpha1) (75 ng);
 - 1 µl BsaI restriktazės (5-10 vnt.);
 - 0,5 µl T4 ligazės (3 vnt.);
 - 1 µl ligazės buferio.
2. Galutinis reakcijos tūris 10 µl. Reakcija vykdyta termocikleryje Mastercycler Gradient (Eppendorf, Vokietija). 25 ciklai kartojant 2 minutes esant +37 °C ir 5 minutes esant +16°C.
3. Gautas vektorius (pDGB3_alpha1+) su chimerinio peptido seka elektroporacijos metodu įterpiamas į elektrokompentines *E. coli* DH5α ląsteles. Visi transformacijos etapai atliekami šaltai, priemonės ir reagentai laikomi ant ledo. Užšaldytos kompetentinės bakterijos švelniai atitirpinamos ir toliau taip pat laikomos ant ledo. 1,5 ml mėgintuvėlyje sumaišoma 40 µl ląstelių suspensijos ir 1-2 µl DNR (pDGB3_alpha1+) ir 60 s inkubujamos ant ledo. Mišinys perkeliamas į atšaldytą 1 mm kiuvetę ir elektroporacija atliekama naudojant Multiporator (Eppendorf, Vokietija). Impulso parametrai: 1,80 kV įtampa, trukmė – 5 ms.
4. Bakterijos iš karto resuspenduojamos 1 ml SOC terpės (2 % triptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės), perkeliama į mėgintuvėlį ir inkubuojama termostate 1 h +37 °C temperatūroje, purtant 225 apm Thermo-Shaker TS-100 (BioSan, Latvija).
5. Po inkubacijos bakterijos sėjamos ant LB (1 % triptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl) agarizuotos (1,5 %) terpės su kanamicinu (50 mg/ml), IPTG (0,5 mM) ir X-gal (40 mg/ml) ir auginamos +37 °C temperatūroje.
6. Po paros ant terpės paviršiaus galima aiškiai matyti bakterijų kolonijas. Kadangi į terpę buvo dėta X-gal galima atskirti sėkmingai transformuotas kolonijas. Šios kolonijos bus baltos spalvos, o kolonijos nešančios nepakitusius vektorius bus mėlynos.

7. Sėkmingai transformuotos kolonijos yra perkeliamos į skystą LB terpę su 50 mg/ml kanamicino ir auginamos per naktį +37 °C temperatūroje. Po to jos iškart naudojamos tolimesniems darbams arba užšaldomos -80 °C temperatūroje.

2.3. Chimerinio peptido vektoriaus gryninimas

Plazmidžių išskyrimas iš *E. coli* atliktas naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Lietuva) pagal gamintojo rekomendacijas.

1. Tinkamos kolonijos pernešamos į skystą LB terpę su 50 mg/ml kanamicino ir ten auginamos 12-16 h, +37 °C temperatūroje purtyklėje (200-250 apm).
2. Po nurodyto laiko bakterijų kultūra surenkama centrifuguojant. Šiam tikslui paimama po ~2 ml pirminės terpės ir centrifuguojama 2 minutes kambario temperatūroje 9279 g.
3. Supernatantas nupilamas, o bakterijos suspenduojamos 250 µl resuspensijos tirpalo. Mėgintuvėlis švelniai supurtomas.
4. Į mišinį įdedama 250 µl lizės tirpalo. Sumaišoma mėgintuvėlį vartant 4-6 kartus iki tirpalas praskaidrėja.
5. Įdedama 350 µl neutralizacijos tirpalo. Iš karto maišoma mėgintuvėlį vartant 4-6 kartus.
6. Mišinys 5 minutes centrifuguojamas (6800 g).
7. Supernatantas atidžiai su pipete perkeliamas į kolonėlę.
8. Mėgintuvėlis su kolonėle centrifuguojamas 1 minutę 9279 g. Skystis iš apatinės mėgintuvėlio dalies nupilamas, kolonėlė įstatoma atgal.
9. Kolonėlė plaunama naudojant 500 µl plovimo tirpalo. Centrifuguojama 30-60 sekundžių. Skystis nupilamas. Šis žingsnis kartojamas dukart.
10. Nupylus skystį kolonėlė dar centrifuguojama 1 min. 9279 g.
11. Kolonėlė perdedama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį. Įdedama 50 µl eliucijos buferio (pipete buferis pilamas į centrą nepaliekiant membranos).
12. Mišinys inkubuojamas kambario temperatūroje 2 min. Po to 2 min. centrifuguojamas 9279 g. 11-12 žingsniai kartojami dukart.
13. Išėmus kolonėlę išgryninta DNR laikoma -20 °C temperatūroje.

2.4. *Agrobacterium tumefaciens* transformacija

1. Gauta konstrukcija (pDGB3_alpha1+) su chimeriniu peptidu elektroporacijos metodu įterpiama į *A. tumefaciens* domestikuotą ląstelių kamieną GV3101 (binarinės sistemos

virulentiškumo vektorius – pMP90). Visi transformacijos etapai atliekami šaltai, priemonės ir reagentai laikomi ant ledo. Užšaldytos agrobakterijos švelniai atitirpinamos ir toliau taip pat laikomos ant ledo. 1,5 ml mėgintuvėlyje sumaišoma 50 µl ląstelių suspensijos ir 1 µl DNR (plazmidės pDGB3_alpha1+) ir 60 s inkubujamos ant ledo. Mišinys perkeliamas į atšaldytą 1 mm kiuvetę ir atliekama elektroporacija. Impulso parametrai: 1,80 kV įtampa, trukmė – 5 ms.

2. Bakterijos iš karto resuspenduojamos 1 ml SOC terpės, perkeliama į mėgintuvėlį ir inkubuojamas termostate 3 h +28 °C temperatūroje, purtant 225 apm.

3. Po inkubacijos bakterijos sėjamos YEP (10 g/l peptono, 10 g/l mielių ekstrakto, 5 g/l NaCl) agarizuotoje (2 %) terpėje su gentamicinu (50 µg/ml), kanamicinu (50 µg/ml) ir rifampicinu (50 µg/ml) ir auginamos +28 °C temperatūroje.

4. Po 2-3 dienų ant terpės paviršiaus galima aiškiai matyti bakterijų kolonijas. Bakterijų kolonijos yra perkeliama į skystą YEP terpę su antibiotikais ir auginamos 2 paras +28 °C temperatūroje. Po to agrobakterijos iškart naudojamos tolimesniems darbams arba užšaldomos -80 °C temperatūroje.

2.5. *Agrobacterium tumefaciens* kolonijų PGR ir elektroforezė

Agrobakterijų transformacija patvirtinta kolonijų PGR analize.

1. Bakterijų kolonija suspenduojama 100 µl dH₂O. Sudaromas PGR mišinys (10 µl):

- 1,5 µl bakterijų suspensijos (50 ng);
- 3 µl dH₂O;
- 5 µl 1X MyTaq Mix (Bioline);
- 0,5 µl tiesioginio pradmens ir atvirkštinio pradmens mišinio (0,5 µM) (žr. 2.1. pav.).

Tiesioginis pradmuo: GCGC **CGTCTC** GCTCG **AATG** CACCACCATCACCACCA

Atvirkštinis pradmuo: GCGC **CGTCTC** GCTCA **AAGC** TTAAGGGACTCCTTCTCCAG

2.1. pav. Pradmenys naudoti chimerinio peptido genui apmplifikuoti kolonijų PGR metodu. Pradmuo pažymėtas raudonai, žaliai pažymėtos fermentų atpažinimo sekos, o mėlynai – restriktazių kirpimo regionai (autorės iliustracija).

2. Atliekama PGR. Naudojamas termocikleris “Qcycler II” (Quanta Biotech, Jungtinė Karalystė). Pradinė denatūracija – +95 °C (2 min). Tuomet 25 ciklai: denatūracija – +95 °C (30

s), pradmenų sąveika - +55 °C (45 s), DNR sintezė - +72 °C (1 min). Tuomet vykdoma galutinė DNR sintezė - +72 °C (10 min). Mėginiai atšaldomi iki +4 °C.

3. Po PGR gauti produktai analizuojami MCE-202 MultiNA (Shimadzu) kapiliarinės elektroforezės sistema naudojant DNR-12000 (Shimadzu) reagentų rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. DNR fragmentų ilgio standartas - "GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder" (Thermo Fisher Scientific). Gauti rezultatai įvertinti „MultiNA Viewer“ (Shimadzu) kompiuterine programa.

2.6. Protoplastų išskyrimas

2.6.1. *Nicotiana tabacum* protoplastų išskyrimas

Protoplastų išskyrimui buvo naudoti *N. tabacum* augalai auginami Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriuje. Tabako klonai auginti MS terpėje su 1 % sacharozės be fitohormonų [59] sterilioje talpoje (+22 °C, fotoperiodas – 16 h) (žr. 2.2. pav.). Populiacija prižiūrima ir atnaujinama laboratorijos darbuotojų.



2.2. pav. Eksperimente naudoti ~4 savaičių amžiaus *N. tabacum* mikroūgliai (autorės nuotrauka).

Fermentai ir fitohormonai yra iš "Duchefa Biochemie" (Nyderlandai). Macerozimo R-10 grynumas >3000 u/g, o celiulazės Onozuka R-10 - >10 000 u/g.

1. 20-500 mg tabako lapų biomasės iš 4-8 savaites augusių *in vitro* augalų atrenkama ir pasveriami, o po to lapai supjaustomi į smulkius (1-2 mm) gabalėlius mini Petri lėkštelėje

naudojant skalpelį 1 ml preplazmolizės terpės (7,35 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ir 54,66 g/l sorbitolio). Po to supjaustyta biomasė užpilama dar 4 ml tos pačios terpės ir laikoma valandą tamsoje.

2. Praėjus valandai preplazmolizės terpė nusiurbama naudojant automatinę pipetę ir likusi biomasė užpilama 5 ml K3 terpės [60] su 0,4 M sacharozės priedu, ištirpintais fermentais (0,1-3 % celulazės ir 0,1-0,6 % macerozimo) ir 0,2 mg/l NAR bei 0,25 mg/l BAP. Mišinys inkubuojamas 0,5-24 valandas tamsoje esant +22-30 °C temperatūrai termostate arba purtyklėje, šią nustatčius žemiausiam režimui.

3. Po inkubacijos periodo išsilaisvinę atskiri protoplastai atskiriami nuo likusių terpėje audinio gabalėlių ir ląstelių grupių filtruojant mišinį per nailoninį filtrą (porų dydis - 60 μm). Protoplastų suspensija atskiesta 1:1 5 ml CPW (CPW10, CPW16 arba CPW20) terpės (101 mg/l KNO_3 , 1,48 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 246 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 27,2 mg/l KH_2PO_4 , 16 mg/l KI, 0,025 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ bei priklausomai nuo terpės stiprumo 100 g/l, 160 g/l arba 200 g/l sacharozės) centrifuguojama ~100 g jėga 5 minutes +10 °C. Tam naudoti 15 ml talpos mėgintuvėliai. Bandyje naudota centrifuga Jouan BR4i (Prancūzija).

4. Po pirmojo centrifugavimo paviršiuje plaukiojantys protoplastai surenkami plataus antgalio automatinė pipete. 2 ml protoplastų suspensijos perkeliama į 8 ml CPW terpės. Viso proceso metu labai svarbu suspensijos per smarkiai nesupurtyti. Vėl centrifuguojama prieš tai minėtomis sąlygomis.

5. Po antrojo centrifugavimo procedūra pakartojama analogiškai tik vietoje CPW terpės galutiniam praplovimui naudojama W5 terpė (18,4 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 9 g/l NaCl, 0,8 g/l KCl, 1 g/l gliukozės).

6. Po centrifugavimo W5 terpėje protoplastai nusėda į mėgintuvėlio dugną. Eksperimentui pavykus mėgintuvėlio dugne kartais galima pastebėti plaukiojančią žalsvos spalvos gleives primenančią masę. Iš mėgintuvėlio automatinė pipete išsiurbiamas beveik visas supernatantas, lieka mažiau nei 0,5 ml skysčio. Lašas suspensijos sumaišoma su lašeliu fluorescuojančių dažų (naudotas fluoresceino diacetatas – FDA; jo koncentracija 5 mg/ml etanolio). Paveikus suspensiją FDA gyvos ląstelės fluorescuos žaliai, negyvos nefluorescuos. Mikroskopuojama su fluorescensiniu mikroskopu (Nikon Eclipse 80i, Vokietija) naudojant FITC filtrą ir natūralią šviesą.

7. Apskaičiuojama protoplastų koncentracija naudojant Gorajjevo ar Fuchs-Rosenthal kamerą. Siekiama, kad galutinė protoplastų koncentracija būtų 5×10^5 vnt/ml. Jei reikia suspensija atskiedžiama iki pageidaujamos koncentracijos skysta modifikuota 8p terpe [61] su

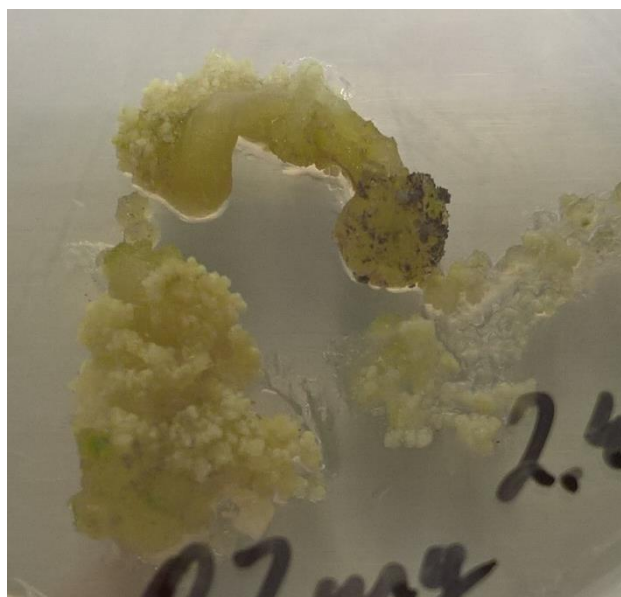
0,4M gliukozės, 1,0 mg/l 2.4D ir 0,5 mg/l BAP. Tuo pat metu tikrinamas ir protoplastų gyvybingumas.

2.6.2. *Daucus carota* protoplastų išskyrimas

Morkų protoplastų išskyrimui buvo naudotas *Daucus carota* L. (ssp. *sativus*, veislė „Ieva“) kalius

(žr. 2.3. pav.). Augalai auginti Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriuje, termoreguliacinėje kameroje (fotoperiodas – 8 h, +5 °C temperatūra). Mėginiai prižiūrimi laboratorijos darbuotojų.

Bandymas atliktas analogiškai tabako protoplastų išskyrimui, tik pirmame žingsnyje vietoj augalo lapų, eksperimente naudotas morkų kalius.



2.3. pav. Eksperimente naudotas morkų kalius (autorės nuotrauka).

2.7. Lapo disko transformacija

2.7.1. *Nicotiana tabacum* lapo disko transformacija ir ūglių regeneracija Nr. 1

Naudoti antibiotikai ir fitohormonai yra iš „Duchefa Biochemie“ (Nyderlandai). Kanamicino grynumas – >750 IU/mg, cefatoksimo – 916-964 µg/mg.

1. Pirmiausia paruošiamos bakterijos. Viena transformuota *A. tumefaciens* kolonija su tiksline plazmide perkeliama į skystą LB terpę (50 mg/l kanamicino ir 50 mg/l rifampicino). Bakterijos auginamos dvi dienas +28 °C purtyklėje „Orbital Shaker Incubator“ (MRC, Kinija) ~120 apm tamsoje.

2. Po dviejų dienų LB terpė su agrobakterijomis perkeliama į 15 ml talpos centrifuginius mėgintuvėlius. Centrifuguojama 1383 g centrifuga 5415D (Eppendorf, Vokietija) 10 minučių kambario temperatūroje. Nupilamas supernatantas ir bakterijos resuspenduojamos 5 ml regeneracinės terpės (RM). RM yra modifikuota MS terpė (30 g/l sacharozės, 2 mg/l BA, 0,2 mg/l NAR, pH 5,6)

3. Fotometru Biophotometer (Eppendorf, Vokietija) išmatuojama bakterijų koncentracija. Tam į kiuvetę įpilama 0,5 ml gerai sumaišytos terpės su bakterijomis. Optinis tankis matuojamas 600 nm ilgio bangomis. Eksperimente buvo naudotos bakterijų koncentracijos nuo 0,6 iki 0,8 OD. Esant per didelei bakterijų koncentracijai praskiedimui naudota RM terpė.

4. Paruošiami augalų eksplantai. Nuo ankstesniame bandyme naudotų tabako mikroūglių atskiriami sveiki lapeliai. Šie supjaustomi į 5-8 mm dydžio fragmentus.

5. Lapų fragmentai užpilami bakterijų suspensija. Bakterijos su eksplantais laikomi 30 minučių +28 °C temperatūroje kartais juos švelniai supurtant.

6. Po pusvalandžio lapų fragmentai išimami iš bakterijų suspensijos, perkeliama ant filtrinio popieriaus ir džiovinami ~5 minutes. Išdžiovinti eksplantai perkeliama į steriliais Petri lėkštes ant filtrinio popieriaus suvilgyto RM terpe (~2 ml vienai lėkštei). Kokultivavimas vykdomas 2-3 dienas tamsoje +25 °C temperatūroje.

7. Po šio periodo eksplantai perplaunami RM terpe su cefatoksimu (1g/l) du kartus skirtingose talpose po 3 minutes. Eksplantai išdžiovinami ant filtrinio popieriaus ir po ~10 vienetų perkeliama į Petri lėkštes su agarizuota (8 g/l bakto-agaro) selektyvia RM terpe (50 mg/l kanamicino ir 250 mg/l cefatoksimo). Antibiotikai naudojami siekiant sunaikinti jau savo darbą atlikusias agrobakterijas, tokiu būdu padidinant eksplanto regeneracijos tikimybę.

8. Petri lėkštutės izoliuojamos naudojant specialias juosteles. Transformuoti eksplantai auginami +22 °C temperatūroje su 16 h fotoperiodu. Mėginiai persodinami į šviežią terpę kas 2-3 savaites iki regeneruoja ūgliai.

9. Regeneravę ūgliai toliau perkeliama į šaknijimosi terpę (MS terpė su 3 % sacharozės ir tokiu pat antibiotikų kiekiu kaip ir prieš tai RM terpeje).

2.7.2. *Nicotiana tabacum* lapo disko transformacija ir ūglių regeneracija Nr. 2

1. Pirmiausia paruošiami augalų eksplantai. Nuo tabako mikroūglių atskiriami sveiki lapeliai. Šie supjaustomi į 5-8 mm dydžio fragmentus. Juos kultivuojame 2 savaites ant

agarizuotos MS terpės (2 % sacharozės, 0,2 mg/l NAR ir 2,5 mg/l BA). Lėkštelės izoliuojamos specialia juostele. Eksplantai auginami +22 °C temperatūroje su 16 h fotoperiodu.

2. Dvi dienos prieš pasibaigiant dviejų savaitių eksplantų kultivavimo periodui transformacijai pradedamos ruošti agrobakterijos. Jų paruošimas sutampa su *Nicotiana tabacum* lapo disko transformacija Nr.1 1-3 žingsniais minėtais ankstesniame skyrelyje. Bakterijų koncentracija gali būti nuo 0,2 iki 0,7 OD.

3. Po dviejų savaitių lapų fragmentai būna vizualiai didesni. Matosi patikusi lapo struktūra. Fragmentai tampa kietesni ir labiau primena kaliaus darinį, tačiau palaiko pirminę lapo išvaizdą. Prieš atliekant transformaciją fragmentai subadomi sterilia mikro-adata. Tuomet analogiškai ankstesniojo skyrelio 5-6 žingsniui atliekama transformacija ir kokultivacija.

4. Po šio periodo eksplantai perplaunami TSM terpe su timentinu (1g/l) du kartus skirtingose talpose po 3 minutes. Eksplantai išdžiovinami ant filtrinio popieriaus ir po ~10 vienetų perkeliama į Petri lėkštelės su agarizuota (8 g/l bakto-agaro) selektyvia TSM terpe (50 mg/l kanamicino ir 250 mg/l timentino). Svarbu paminėti, kad į TSM terpę po autoklavavimo dedamas IAR fitohormonas (0,2 mg/l).

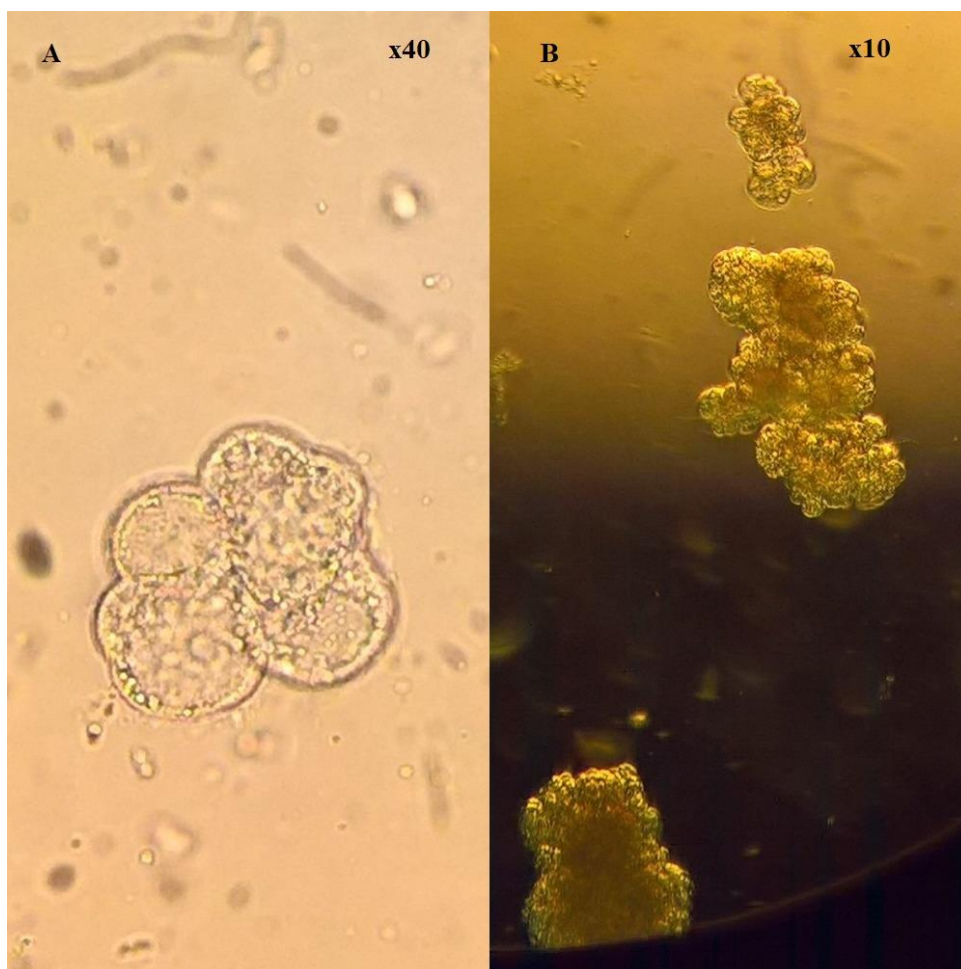
5. Petri lėkštutės izoliuojamos naudojant specialias juosteles. Transformuoti eksplantai auginami +22 °C temperatūroje su 16 h fotoperiodu. Mėginiai persodinami į šviežią terpę kas savaitę iki regeneruoja ūgliai.

6. Regeneravę ūgliai toliau perkeliama į šaknijimosi terpę (MS terpė su 3 % sacharozės ir tokiu pat antibiotikų kiekiu kaip ir prieš tai TSM terpėje).

Protokolas pritaikytas pagal mokslininkų grupės straipsnį [46].

2.8. *Daucus carota* ląstelių suspensijos transformacija ir kalių regeneracija

Morkų suspensijos transformacijai buvo naudotos *Daucus carota* ssp. *sativus* ląstelių suspensijos auginamos Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriaus laboratorijoje (žr. 2.4. pav.). Suspensinės kultūros prižiūrimos ir atnaujinamos laboratorijos darbuotojų. Jos auga kambario temperatūroje, purtyklėje (~120 apm). Protokolas pritaikytas morkoms iš 2004 metų straipsnio [47].



2.4. pav. Morkų ląstelių suspensija prieš transformaciją. Vaizdas per mikroskopą (A – x40 padidinimas, B – x10 padidinimas). Matomi ląstelių agregatai (autorės nuotrauka).

1. Ląstelės auginamos talpose užpildytose trečdaliu su 20-30 ml MKK (modifikuota MS terpė su 0,1 % kazeino hidrolizato, 30 g/l sacharozės ir 0,3 mg/l 2.4D) terpės. 2,5 ml savaitės amžiaus suspensijos perkeliama į 25 ml šviežios MKK terpės ir auginama dar dvi dienas.
2. 4-24 h prieš atliekant transformaciją paruošiamos agrobakterijos. Viena transformuota *A. tumefaciens* kolonija su tiksline plazmide perkeliama į skystą LB terpę (50 mg/l kanamicino ir 50 mg/l rifampicino). Bakterijos auginamos iki 24 h +28 °C purtyklėje (~160 apm) tamsoje.
3. Po dviejų dienų 5 ml paaugintos morkų suspensijos perkeliama į 25 ml šviežios MKK terpės su 500 μM acetosiringono (AS). AS yra fenolinis darinys, kuris padidina transformacijos agrobakterijomis efektyvumą.
4. Dar 5 ml šios suspensijos perkeliama į 25 ml šviežios MKK terpės kondicinei terpei sukurti. Suspensija kondicinei terpei sukurti bus auginama dar dvi dienas.

5. Toliau ruošiamos agrobakterijos. Po numatyto laiko LB terpė su agrobakterijomis perkeliama į 15 ml talpos centrifuginius mėgintuvėlius. Centrifuguojama 1383 g, 10 minučių kambario temperatūroje. Nupilamas supernatantas ir bakterijos resuspenduojamos 5 ml MKK terpės.

6. 100 µl agrobakterijų suspensijos tris kartus perplaunama su 1 ml MKK terpės centrifuguojant 18 000 g po 2 minutes.

7. Fotometru pamatuojama agrobakterijų suspensijos koncentracija. Bangos ilgis – 600 nm. Siekiama kad OD būtų 0,1-0,15. Esant poreikiui praskeidimui naudojama MKK terpė.

8. 10 ml suspensijos su AS perkeliama į naują talpą ir infekuojama su 100 µl agrobakterijų suspensijos (OD₆₀₀ 0,1-0,15). Infekuota suspensija inkubuojama tamsoje +27 °C temperatūroje nemaišant.

9. Po dviejų dienų infekuota suspensija perkeliama į 50 ml talpos mėgintuvėlį ir centrifuguojama ~400 g 10 minučių +10 °C temperatūroje. Nuosėdos 2-3 kartus praplaunamos su šviežia MKK terpe. Po paskutinio plovimo visas supernatantas nusiurbiamas automatine pipete.

10. Dvi dienas auginta suspensija kondicinei terpei centrifuguojama ~400 g 10 minučių +10 °C temperatūroje. Paimama 20 ml supernatanto, o nuosėdos pašalinamos.

11. Infekuotos morkų nuosėdos iš 9 -tojo žingsnio užpilamos 20 ml kondicinės terpės su timentinu (250 mg/ml) agrobakterijų eliminavimui.

12. Ši suspensija auginama talpose kaip minėta 1 -ajame žingsnyje tris dienas tamsoje purtyklėje ~130 apm.

13. Po trijų dienų suspensija perkeliama į 50 ml talpos mėgintuvėlį ir centrifuguojama ~400 g 10 minučių +10 °C temperatūroje. Nusėdusios ląstelės resuspenduojamos 10 ml MKK terpės.

14. Suspensija perkeliama ant agarizuotos MKK terpės Petri lėkštelėse su timentinu (250 mg/l) ir kanamicinu (100 mg/l). 1ml suspensijos vienai standartinei Petri lėkštelei.

15. Lėkštelės inkubuojamos tamsoje kelias savaites iki kol susidaro aiškiai matomi kaliai. Regeneravę kaliai vėliau susmulkinami ir dedami į skystą MKK terpę siekiant sukurti transformuotų morkų ląstelių suspensiją.

2.9. *Daucus carota* hipokotilių transformacija ir kalių regeneracija

Naudoti antibiotikai yra iš “Duchefa Biochemie” (Nyderlandai).

1. 7 dienas prieš transformaciją pradedami ruošti morkų augalai. Morkų sėklos sterilinamos 70% etilo alkoholio tirpale praskalaujant vandeniu. Tada jos mirkomos 10 minučių 10% natrio hipochloride, o po to nuplaunamos vandeniu. Po plovimo sėklos perkeliama į Petri lėkšteles su agarizuota MS terpe, kad sudygtų.

2. Pirmiausia paruošiamos bakterijos. Viena transformuota *A. tumefaciens* kolonija su tiksline plazmide perkeliama į 200 ml skystos LB terpės (50 mg/l kanamicino ir 50 mg/l timentino). Bakterijos auginamos dvi dienas +28 °C purtyklėje “Orbital Shaker Incubator” (MRC, Kinija) ~120 apm tamsoje.

3. Po dviejų dienų LB terpė su agrobakterijomis perkeliama į keturis 50 ml talpos centrifuginius mėgintuvėlius. Centrifuguojama 1383 g centrifuga 5415D (Eppendorf, Vokietija) 10 minučių kambario temperatūroje. Nupilamas supernatantas ir bakterijos kiekviename mėgintuvėlyje resuspenduojamos 1 ml B5 terpės [83]. Resuspenduotos bakterijos perpilamos į vieną 50 ml tūrio mėgintuvėlį.

4. Fotometru „Biophotometer“ (Eppendorf, Vokietija) išmatuojama bakterijų koncentracija. Tam į kiuvetę įpilama 0,5 ml gerai sumaišytos terpės su bakterijomis. Optinis tankis matuojamas esant 600 nm ilgio bangomis. Esant per didelei bakterijų koncentracijai praskiedimui naudota B5 terpė. Pageidautinas OD yra 0,5.

5. Savaitę auginti morkų augalai yra paruošiami transformacijai. Morkų ūgliai apipjaustomi paliekant tik hipokotilius. Jei reikia hipokotiliai supjaustomi 1 cm ilgio gabaliukais. Hipokotiliai pamerkami į reikiamos koncentracijos agrobakterijų tirpalą ir jame laikomi 2 minutes švelniai maišant. Po to tirpalas yra nupilamas, o hipokotiliai nudžiovinami ant filtrinio popieriaus.

6. Nudžiuvę hipokotiliai perkeliama ant agarizuotos (8 g/l bako-agaro) B5 terpės ir dvi dienas laikomi inkubatoriuje esant +28 °C temperatūrai.

7. Po dviejų dienų hipokotiliai persodinami ant agarizuotos selektyvios B5 terpės (50 mg/l kanamicino ir 300 mg/l timentino). Dar po savaitės hipokotiliai vėl persodinami į tokią pat terpę, o po dviejų savaičių terpėje jau sumažinamas timentino kiekis (250 mg/l). Hipokotiliai kas savaitę persodinami į naują terpę iki kol susiformuoja kaliai ir regeneruoja morkos ūgliai. Per tą laiką hipokotiliai auginami inkubatoriuje tamsoje esant +23 °C temperatūrai.

2.10. *Daucus carota* hipokotilių DNR išskyrimas

1. Iš ~6 savaites augintų kalių paimama po 0,1-0,2 g audinio (dalis kaliaus paliekama toliau augti) ir įdedama į 2 ml mėgintuvėlį ir užpilama skystu azotu (į mėgintuvėlius taip pat įdedami 2-3 šratai). Mėgintuvėlis azote laikomas valandą. Po to mėginiai sumalami malūnu (28 supurtymai per sekundę) (MM 400, Retsch). Tai trunka 3 minutes.

2. Po malimo mėgintuvėlių turinys užpilamas 0,9 ml CTAB buferio ir mėgintuvėliai inkubuojami 30 min. vandens vonelėje “Thermomixer comfort” (Eppendorf, Vokietija).

3. Po inkubacijos į mėgintuvėlius įpilama po 0,9 ml chloroformo-izoamilo alkoholinio mišinio (24:1). Mėgintuvėliai inkubuojami 10 min. kambario temperatūroje, kas 2 min. juos švelniai pavartant. Po to mėginiai centrifuguojami centrifuga 5415D (Eppendorf, Vokietija) kambario temperatūroje 5 min. 4000 g jėga.

4. Po centrifugacijos viršutinis sluoksnius būna aiškiai atsiskyręs nuo priemaišų. Jis yra švelniai nusiurbiamas pipete ir perkeliamas į 1,5 ml mėgintuvėlį. 3-4 žingsniai iš viso pakartojami tris kartus.

5. Po paskutinio plovimo alkoholių mišiniu, į supernatantą įpilama 0,6 ml 95 % etilo alkoholio (+4 °C) ir švelniai supurtoma. Tuomet mėginiai inkubuojami -20 °C temperatūroje 30 min.

6. Po šios inkubacijos mėginiai centrifuguojami 2,5 min. 2500 g. Po to supernatantas atsargiai nupilamas ir į mėgintuvėlius įpilama 1,3 ml plovimo buferio (70% etanolis ir 10 mM amonio acetatas) (+4 °C). Mišinys inkubuojamas -20 °C temperatūroje 1h.

7. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 2,5 min. 2500 g ir supernatantas atsargiai nupilamas. Į mėgintuvėlius įpilame po 0,6 ml 70 % etanolio, mėgintuvėliai laikomi 12 min. +4 °C temperatūroje, o po to supernatantą nupilame. Procedūrą pakartojame su 95 % etanoliumi.

8. Po galutinio plovimo likę nuosėdos yra džiovinamos ~12 min. termostate (Hybridization Oven/Shaker, Amersham Biosciences, Jungtinė Karalystė) +37 °C temperatūroje.

9. Išdžiūvusios nuosėdos yra ištirpinamos 100 µl Tris-EDTA buferio +4 °C temperatūroje. Po 10-20 minučių nanofotometru (Implen, Vokietija) patikrinamos DNR koncentracijos.

2.11. *Daucus carota* hipokotilių PGR ir elektroforezė

1. Sudaromi du PGR mišiniai (po 10 µl):

- 1,5 µl DNR (50 ng);
- 3 µl dH₂O;
- 5 µl 1X MyTaq Mix (Bioline);
- Pirmam mišiniui imama 0,5 µl tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinio peptido sekai atpažinti (0,5 µM) (žr. 2.1. pav.), o antram mišiniui – 0,5 µl tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinio agrobakterijų *vir* sekai atpažinti (0,5 µM) (tiesioginis pradmuo – CGAAACGCTGTTTCGGCCTGTGG, atvirkštinis pradmuo – GTTCAGCAGGCCGGCATCCTGG).

2. Atliekama PGR. Naudojamas termocikleris “Qcycler II” (Quanta Biotech, Jungtinė Karalystė). Pradinė denatūracija – +95 °C (2 min). Tuomet 30 ciklų: denatūracija – +95 °C (30 s), pradmenų sąveika - +58 °C (45 s), DNR sintezė - +72 °C (1 min). Tada vykdoma galutinė DNR sintezė - +72 °C (5 min). Mėginiai atšaldomi iki +4 °C.

3. Po PGR gauti produktai analizuojami MCE-202 MultiNA (Shimadzu) kapiliarinės elektroforezės sistema naudojant DNR-12000 (Shimadzu) reagentų rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. DNR fragmentų ilgio standartas - "GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific). Gauti rezultatai įvertinami „MultiNA Viewer“ (Shimadzu) kompiuterine programa.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

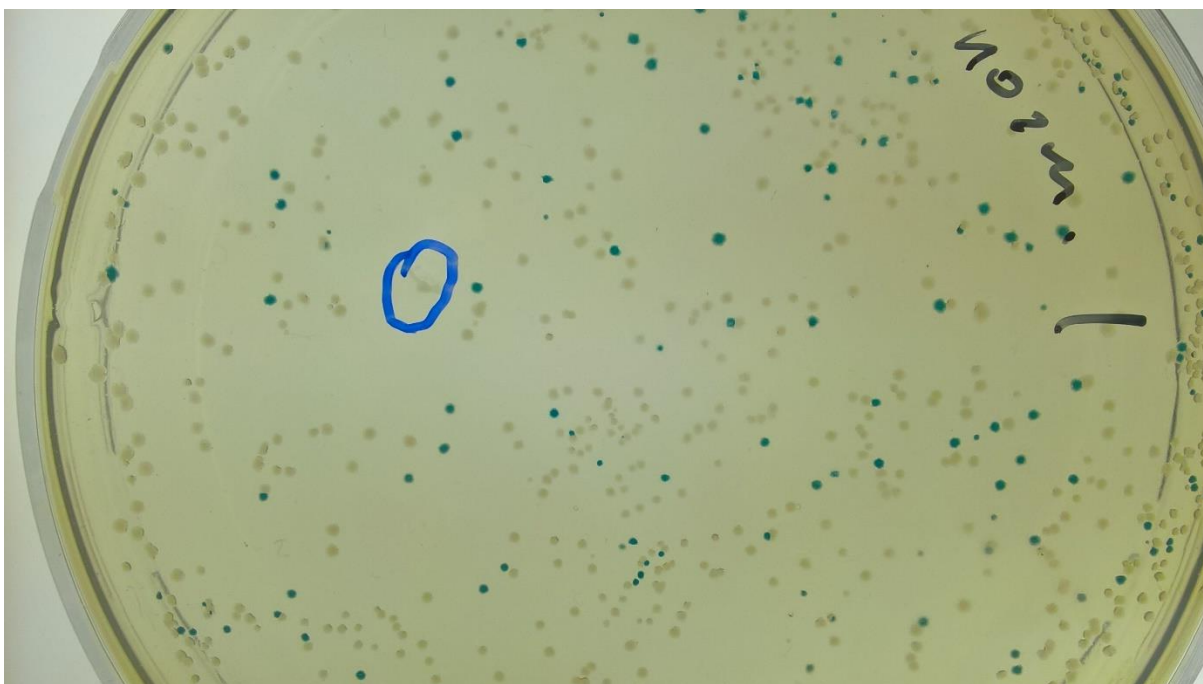
3.1. Binarinio augalų vektoriaus kūrimas ir pagausinimas *E. coli* ląstelėse

Pirmiausia siekiant sukurti binarinės sistemos vektorių, nešantį chimerinio peptido seką buvo atlikta „GoldenBraid 3.0” daugianario surinkimo reakcija. Tam naudotas pDGB3_alpha1 vektorius. Po reakcijos gautas vektorius buvo elektroporacijos metodu įterptas į *E. coli* DH5 α kamieno bakterijas. Sėkmingai bakterijų transformacijai įvertinti buvo naudota α -komplementacijos sistema: į bakterijų augimo LB terpę idėjus X-gal junginio kolonijos nusidažo mėlynai, jei vektorius jose neturi įterptos tikslinės DNR arba yra baltos, jei vektorius turi įterptą DNR fragmentą.

Toks patikros mechanizmas pirmą kartą buvo panaudotas sukūrus specifines pUC plazmidės 1982 -aisiais metais [62]. Nuo to laiko šis atrankos metodas plačiai taikomas molekuliniame biologijoje, specifiskai molekuliniam klonavime [63].

Eksperimento metu į terpę buvo dėtas ir IPTG junginys. Jis naudojamas *lac* operono raiškos indukcijai. Šiame operone ir turėtų įsiterpti tikslinė DNR. Svarbu paminėti, kad siekiant tokiu būdu atrinkti sėkmingus transformantus reikia tinkamai pasirinkti *E.coli* kamieną. Šis turi turėti mutuoatą *lacZ* geną su specifine delecija, o naudojamas vektorius turi turėti *lacZ α* seką.

Atlikto bandymo metu ant LB terpės po paros buvo galima aiškiai vizualiai išskirti transformuotas kolonijas (žr. 3.1. pav.). Pastebėta, kad sėkmingai transformuotų kolonijų buvo žymiai daugiau nei nesėkmingai transformuotų. Vizualinės patikros metu nebuvo pastebėta palydovinių kolonijų. Tai rodo, kad transformacija buvo sėkminga. Viena iš baltų kolonijų atsitiktiniu būdu buvo atrinkta tolimesniam plazmidinio vektoriaus išskyrimui. Šis vektorius toliau buvo naudojamas *A. tumefaciens* konstrukto kūrimui.



3.1. pav. Transformuotų *E. coli* bakterijų kolonijos ant LB terpės su X-gal junginiu. Inkubacijos periodas – 1 para. Matomos nešančios tikslinį DNR intarpą (baltos) ir jo neturinčios (mėlynos) kolonijos. Apibrėžta kolonija buvo naudota tolimesniuose darbuose (autorės nuotrauka).

3.2. *Agrobacterium tumefaciens* konstruktas

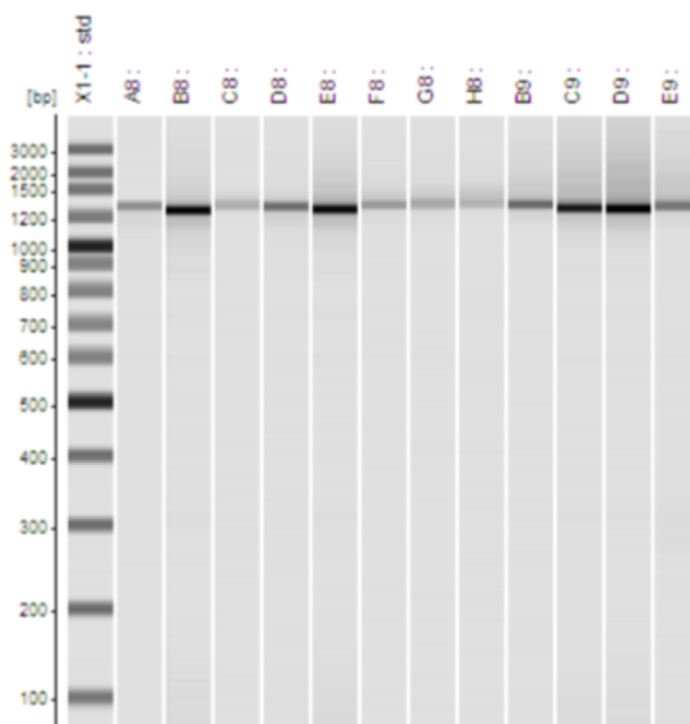
Norint sukurti *A. tumefaciens* bakterinį konstruktą, nešantį chimerinio peptido seką, buvo naudotas domestikuotas agrobakterijų kamienas GV3101. Kamieno binarinės sistemos virulentiškumo vektorius – pMP90.

GV3101 kamienas yra sukurtas prieš kelis dešimtmečius [64] ir yra vienas plačiausiai naudojamų agrobakterijų kamienų. Auglius keliantys genai yra pašalinti iš plazmidės.

Tikslinė DNR į bakterijas buvo pernešta elektroporacijos metodu. Metodas analogiškas *E. coli* transformacijai. Po transformacijos agrobakterijos buvo augintos and YEP terpės. Po kelių dienų buvo galima vizualiai išskirti pavienes bakterijų kolonijas. Dvylika kolonijų atsitiktinai buvo atrinktos atlikti kolonijų PGR ir tolimesniam auginimui LB terpėje.

Kolonijų PGR produktų kapiliarinės elektroforezės analizės metu panaudojus specifinius pradmenis chimeriniam peptido genui atpažinti, buvo sėkmingai išskirti DNR sekos fragmentai, kurių ilgis siekė ~1200 bp (žr. 3.2. pav.). Visose tirtose kolonijose buvo užfiksuotas pageidautinas fragmentas. Analizei buvo naudoti klonavimo pradmenys, kurie turi papildomus adapterius, tad papildomai prisideda tam tikras kiekis nukleotidų ir teorinis sekos ilgis yra 1135 bp. Dėl kapiliarinės

elektroforezės ypatumų fragmentai fiksuojami didesni nei turėtų būti. Tolimesniems darbams atlikti buvo pasirinkta E8 kolonija.



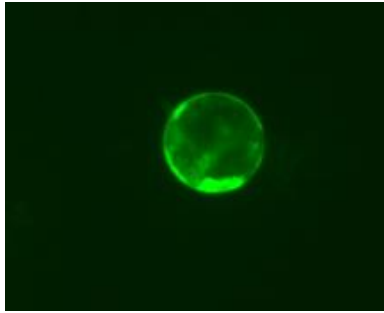
3.2. pav. Agrobakterijų kolonijų PGR produkto kapiliarinės elektroforezės rezultatai. X1 - DNR fragmentų ilgio standartas. Matomi ~1200 bp ilgio sekų fragmentai (autorės iliustracija).

Kolonijų PGR metodas yra itin plačiai taikomas norint patikrinti ar po transformacijos bakterijose ar mielėse buvo sėkmingai įterptas vektorius su tiksline genetinė medžiaga [65].

3.3. Protoplastų išskyrimas iš *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota*

Protoplastų išskyrimui buvo naudoti *N. tabacum in vitro* ūgliai ir *Daucus carota ssp. sativus* kaliai.

Šio eksperimento metu protoplastų išskyrimo iš tabako augalų *in vitro* protokolas buvo daugelį kartų modifikuotas, kadangi pirminis protokolas pakartotinai nedavė pageidautinų rezultatų. Konkrečiai buvo susiduriama su nepakankamu protoplastų kiekiu augalo regeneracijai (žr. 3.3. pav.). Siekiant sėkmingos augalo regeneracijos reikalinga protoplastų koncentracija yra bent 5×10^5 vnt./ml.



3.3. pav. Nuotraukoje matomas tabako protoplastas išskirtas šio tyrimo metu (autorės nuotrauka).

Po pirminės nesėkmės buvo nuspręsta analizuoti literatūrinius duomenis ir ieškoti alternatyvių protokolų protoplastų skyrimui iš tabako arba būdų pirminį protokolą modifikuoti.

Nagrinėtuose straipsniuose esminiai protokolo žingsniai buvo analogiški naudotiems ir šio eksperimento metu, t.y. augalo biomasės susmulkinimas siekiant padidinti augalo paviršiaus plotą prieinamą fermentams, biomasės ardymas naudojant fermentus, kurių pagrindinis yra celulazė, bei tolimesnis fermentų išplovimas švelniai centrifuguojant ir naudojant specifines terpes su druskomis ir osmolitais siekiant išvengti ląstelių osmosinio šoko [66-74].

Kai kuriuose protokoluose taip pat naudojamas papildomas plazmolizės žingsnis prieš ląstelių sienelės ardymą fermentais. Taip siekiama apsaugoti ląsteles nuo staigaus šoko praradus sieneses bei padidinti jų išgyvenamumo tikimybę [68,70]. Šis etapas buvo naudotas ir šiame bandyme.

2011 -ųjų metų straipsnyje apie *N. glauca* protoplastus, minimi papildomi etapai, kurie nebuvo naudoti šio bandymo metu. Šiame darbe taip pat atliekama ir ląstelių plazmolizė. Dvi dienas prieš pradėdant išskyrimo procesą augalai yra inkubuojami tamsoje. Anot autorių, tai padidina ląstelių išgyvenamumą ir išskirtų protoplastų kiekį. Po fermentinės inkubacijos mišinys yra purtomas 60 apm greičiu 15 min. Šis procesas turėtų palengvinti protoplastų išsilaisvinimą. Tuomet nufiltruojamos priemonės. Aprašyto bandymo metu buvo pasiekta $5-7 \times 10^5$ vnt./ml protoplastų koncentracija [66].

Analizuojant literatūrą buvo pastebėta, kad dauguma skirtumų tarp įvairių autorių naudojamų metodų yra susiję su ląstelių sienelės fermentinio ardymo etapu. Autoriai aptaria skirtingus fermentų kiekius, skirtingus laikymo fermentinėje terpėje periodus, skirtingas inkubacijos temperatūras [71]. Taip pat ląstelės gali būti inkubuojamos purtyklėje itin švelniais sąlygomis, arba rankiniu būdu supurčius terpę tam tikrais laiko intervalais. Kituose straipsniuose patariama ląsteles inkubuoti termostate visai jų nejudinant [67].

Jung ir kt. straipsnyje minima kaip svarbu yra nustatyti ne tik tinkamas fermentų koncentracijas, bet ir ląstelių laikymo trukmę fermentinėje terpėje. Anot autorių, tiek per didelės fermentų koncentracijos, tiek per ilgas inkubacijos periodas yra vienodai žalingi augalo ląstelėms ir gali

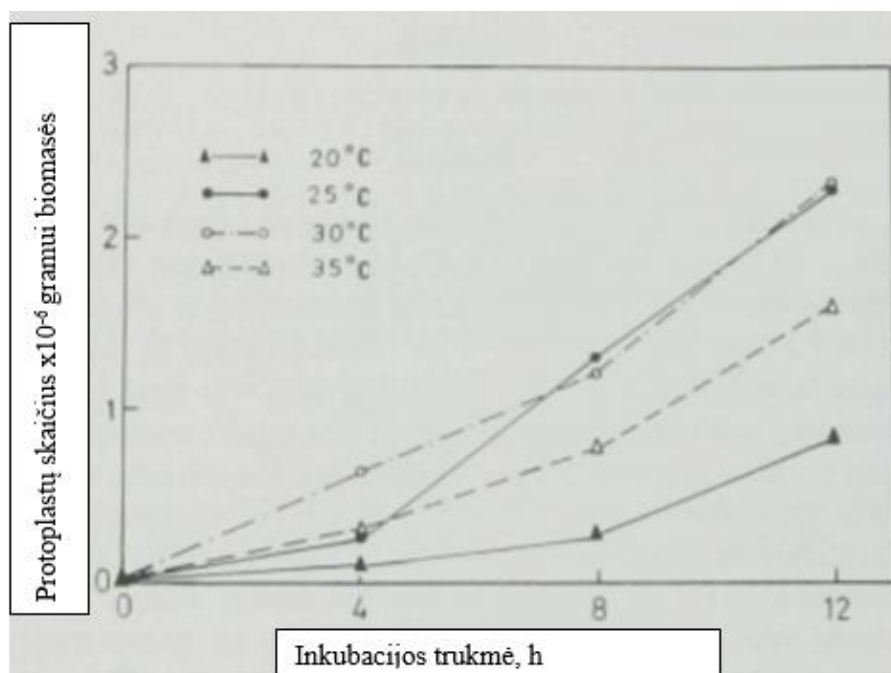
neigiamai paveikti galutinį išskirtų gyvybingų protoplastų kiekį. Autoriai savo darbe naudojo kiek įmanoma mažesnes fermentų koncentracijas (1 % celulazės ir 0,4 % macerozimo) ir kiek įmanoma trumpesnę inkubacijos periodą (4 h) [69].

Mokslininkų grupės iš Nyderlandų darbe taip pat minimas trumpas inkubacijos periodas – 2-4 valandos, tačiau šiuo atveju fermentų koncentracijos yra didesnės (2 % celulazės ir 0,5 % macerozimo) [70].

Svarbu paminėti, kad augalų sienelės suardymui dažniausiai naudojama celulazė ir dar bent vienas fermentas. Tai gali būti macerozimas, kaip abiejuose anksčiau minėtuose straipsniuose, arba pektinazė [71, 73]. Minimi ir kiti fermentai, bet šie vartojami žymiai rečiau [72]. Celulazė skirta ląstelės sienelės suardymui, pektinazė ir macerozimas – ląstelių atsiskyrimui.

Gill ir kt. straipsnyje aprašomo tyrimo metu naudota celulazės koncentracija yra viena didžiausių iš visų nagrinėtų protokolų (net 3 % celulazės). Autoriai mini, kad iš pradžių eksperimentuose buvo naudota ir pektinazė, tačiau nors buvo pastebėtas greitesnis protoplastų išsiskyrimas pirminiuose inkubacijos etapuose naudojant šį fermentą kartu su celulaze, galutinis išsiskyrusių protoplastų kiekis buvo toks pats, tad tolimesni autorių bandymai buvo atliekami naudojant tik celulazę [73].

Tame pačiame straipsnyje aprašomas ir bandymas atliktas su fermentinės inkubacijos temperatūra (žr. 3.4. pav.). Tyrimo metu nustatyta, kad optimaliausios inkubacijos temperatūros yra +25 °C ir +30 °C kuomet inkubacijos periodas yra 12 valandų. Prie +25 °C išsiskyrusių protoplastų kiekis yra vidutiniškas iki 4 -tos inkubacijos valandos, o po to jis staigiai kyla ir ties 8 -ta inkubacijos valanda net pralenkia išsiskyrusių protoplastų kiekį esant +30 °C temperatūrai. Ties 12 -ta valanda šie dydžiai susivienodina. Tačiau, anot autorių, nors didesnė inkubacijos temperatūra yra efektyvus būdas siekiant geresnio protoplastų išsiskyrimo, ji sumažina protoplastų gyvybingumą ir regeneracines savybes [73].



3.4. pav. Išskirtų protoplastų skaičiaus gramui biomasės priklausomybė nuo fermentinės inkubacijos trukmės esant skirtingoms temperatūroms [73].

Optimaliam protoplastų išskyrimo protokolui sukurti itin naudingas buvo Sankara Rao ir Prakash straipsnis išleistas 1995 -aisiais metais. Jame buvo aprašomi kalibraciniai eksperimentai atlikti su tabako ląstelių fermentine terpe. Buvo reguliuojamos fermentų koncentracijos ir jų santykis, inkubacijos temperatūra, terpės pH, taip pat naudoti skirtingi osmolitai (žr. 3.1. lentelė) [71]. Verta paminėti, kad bandymuose su protoplastais visų terpių pH yra tarp 5,6 ir 6,0. Kadangi šis intervalas nėra itin platus ir reikšmingi skirtumai keičiant terpių pH jo ribose nėra užfiksuoti, šio eksperimento metu terpių pH nebuvo keičiami.

3.1. lentelė. Protoplastų išskyrimo iš tabako mezofilinio audinio protokolų efektyvumo palyginimas [71].

MgSO ₄ x 7H ₂ O (M)	Man itolis (M)	Celu lazė (% v/v)	Pecti nazė (% v/v)	SP24 9 ferme ntas (% v/v)	Celu lazė (% w/v)	Macer ozimas (% w/v)	Inkuba cijos temper atūra (+°C)	Inkuba cijos trukmė (h)	Protoplastų kiekis (x10 ⁶ /g biomasės)
-	0,5	0,4	0,15	-	-	-	25	8	5-6
-	0,5	0,4	0,15	-	-	-	25	8	5-6
0,1	0,25	1,3	-	2	-	-	30	6	6

-	0,5	0,4	0,15	-	-	-	30	5-6	6
-	0,5	0,4	0,15	-	-	-	32	5	6
-	0,5	-	-	-	1	0,1	25	10-12	2

Analogiški tyrimai buvo aprašyti ir japonų tyrėjų grupės straipsnyje [74] (žr. 3.2. lentelė). Publikacijoje minima, kad autorių sukurtas metodas yra labai greitas ir sąlyginai efektyvus. Fermentinėje terpėje yra 2 % celulazės ir 0,1 % pektoliazės. Protoplastai išsiskiria per pusvalandį.

3.2. lentelė. Protoplastų išskyrimo iš tabako mezofilinio audinio protokolų efektyvumo palyginimas [74].

Pektoliazė (%)	Macerozimas (%)	Protoplastų kiekis x10⁶/g biomasės	Inkubacijos trukmė
0,1	-	4	25 min
0,1	-	5	30 min
-	0,5	5	1,5 h
0,025	-	5	1,5 h
-	0,5	5	2 h

Kitas, dažniau įvairiuose straipsniuose minimas, skirtumas yra osmolitų kiekis terpėse. Dažniausiai kaip osmolitai naudojami cukrūs – gliukozė ar sacharozė [70]. Kartais naudojami alkoholiai – manitolis ar sorbitolis. Taip pat šalia pagrindinio osmolito papildomai naudojamos ir druskos [71]. Sacharozė ne tik suvienodina aplinkos ir viduląstelinį osmotinį slėgį bei apsaugo ląsteles nuo membranų plyšimo, bet ir sudaro klampumo gradientą terpėse, leidžiantį pavienėms ląstelėms išlikti paviršiuje, o ląstelių agregatai ir biomasės priemaišos nusėda centrifuguojant. Straipsniuose siūloma reguliuoti osmolitų koncentracijas siekiant geresnio rezultato. Šio bandymo metu buvo keičiamos terpių sudėtys bei osmolitų kiekis jose. Buvo pastebėta, kad esant per didelei ar per mažai osmolitų koncentracijai, ląstelės buvo linkusios suirti.

Nagrinėtuose straipsniuose minimos ir kitos svarbios detalės siekiant optimalaus protoplastų išskyrimo ir jų tolimesnės regeneracijos. Ayala ir kt. darbe pastebėta, kad naudojant augalus senesnius nei 4-8 sav. žymiai sumažėja išskirtų protoplastų kiekis, nuo $5-7 \times 10^5$ iki 1×10^5 vnt./ml. Straipsnyje teigiama, kad toks pokytis gali pasireikšti dėl augalo ląstelių osmotiškumo ar sienelės atsparumo fermentams kaitos augalui bręstant. Tuo pačiu aptariama ir plazmolizės žingsnio svarba. Jis žymiai padidina ląstelių išgyvenamumą [66].

Literatūroje aprašomuose darbuose naudojami ir *in vitro* ūgliai [73] ir šiltnamiuose auginami augalai [71]. Siekiant labiau standartizuoti metodus arba išvengti užkrato dažniau naudojami *in vitro*

augalai. Taip pat tokiu būdu norima išvengti lapų biomasės sterilizavimo etapo, kuris yra žalingas augalo ląstelėms. Vis dėlto kai kurie autoriai dirba ir su šiltnamiuose ar termoreguliuojamose kamerose augintais augalais [68].

Analizuotuose straipsniuose minima, kad nors didelė dalis augalo biomasės ląstelių virsta protoplastais, apie 80 % jų yra prarandama plovimo etape [73]. Šie skaičiai žymiai skiriasi tarp *Nicotiana rūšių* [66].

Deje, šio eksperimento metu atliktos protokolo modifikacijos nedavė norimų rezultatų. Buvo atlikta nemažai bandymų, kiekvienas po kelis pakartojimus (žr. 3.3. lentelė). Papildomai bandymų metu buvo tikrintos terpių sudėtys ir jų veiksmingumas, terpės buvo reguliariai atnaujinamos. Buvo tikrintas fermentų aktyvumas. Atlikti bandymai ir literatūrinė analizė nepadėjo išspręsti esamų problemų, todėl tolimesnė protoplastų transformacija ir regeneracija nebuvo atlikta.

Kaip minėta anksčiau, protoplastų išskyrimui taip pat buvo naudotas ir *Daucus carota* ssp. *sativus* kaliumi. Šis eksperimentas buvo atliktas naudojant tabako protoplastų išskyrimo metodiką. Bandyme buvo naudoti mažesni fermentų ir osmolitų kiekiai, kadangi kaliumis ląstelės yra pažeidžiamesnės nei lapo ląstelės (žr. 3.3. lentelė). Eksperimento metu neišsiskyrė nei vienas protoplastas. Tikėtina, kad fermentų koncentracija tokiam ląstelių tipui buvo per didelė arba inkubacijos periodas per ilgas.

Literatūrinuose duomenyse nebuvo aptikta informacijos apie morkų protoplastų išskyrimą iš kaliumis. Gali būti, jog šis audinys nepasižymi tinkamomis savybėmis protoplastų išgavimui iš morkų. Kita vertus morkų protoplastai efektyviai gaunami iš ląstelių suspensijų, tad nėra poreikio atlikti bandymus su kaliumi [75, 76].

1977 -tųjų metų straipsnyje buvo rastas protoplastų išskyrimo iš medvilnės kaliumis protokolai. Minėtame straipsnyje naudojama didesnė inkubacijos temperatūra, sąlyginai trumpas inkubacijos periodas. Taip pat naudojami kitokie fermentai ir didesnės jų koncentracijos. Osmolitų kiekis irgi žymiai skyrėsi. Pagal pateiktus duomenis galima daryti prielaidą, kad šiame eksperimente pritaikytas protokolas nėra tinkamas morkų kaliumis protoplastams išskirti [77].

Kitame nagrinėtame straipsnyje aprašomas morkų protoplastų išskyrimas iš ląstelių suspensijos. Pastebėta, kad autoriai naudoja itin didelę celulazės koncentraciją, taip pat į fermentinę terpę dedama ir daug macerozimo. Žymiai skiriasi terpės pH tarp aprašomos šiame straipsnyje ir eksperimente naudotos. Šiame straipsnyje fermentinės terpės pH yra 4,8. Inkubacijos trukmė buvo 10 h, o temperatūra – +30 °C [76].

3.3. lentelė. Tabako protoplastų išskyrimo protokolo modifikacijos ir rezultatai.

Augalas	Biomasės kiekis 5 ml fermentinė s terpės (mg)	Fermentinė s terpės sudėtis (druskos, osmolitai)	Fermentų kiekis (%)		Inkubacij os trukmė fermentin ėje terpėje (h)	Inkubac ijos vieta	Inkubac ijos tempera tūra (+°C)	Sacharozės koncentrac ija CPW terpėje (g/l)	Protoplas tu skaičius (vnt./ml)	Kiti pastebėjimai
			Celulazė	Macerozim as						
<i>N. tabacum</i> <i>in vitro</i>	370	K3	1,5	0,12	16	Purtyklė	22	160	6x10 ⁴	
	210	K3	2	0,12	16	Purtyklė	22	160	3x10 ⁴	
	130	K3	2,5	0,12	16	Purtyklė	22	160	10 ⁴	
	22	K3	1,2	0,12	24	Purtyklė	22	160	10 ⁴	
	210	K3	1,2	0,12	20	Termosta tas	22	160	0	
	208	20 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 0,5 M manitolio, 10 mM MES (FT)	0,1	0,5	20	Termosta tas	22	160	2x10 ⁴	Daug priemaišų
	157	FT	0,1	0,1	18	Termosta tas	25	160	0	Daug priemaišų, daug kristalų

160	FT	1	0,5	18	Termosta tas	25	160	2x10 ⁴	Daug priemaišu, daug kristalų
157	FT	0,1	0,5	18	Termosta tas	25	160	6x10 ⁴	Daug suirusių ląstelių, priemaišu
137	FT	1	0,1	18	Termosta tas	25	160	3x10 ⁴	Daug priemaišu, daug kristalų
100	FT	2	0,6	20	Termosta tas	25	100	1x10 ⁴	
156	FT	1	0,4	4	Termosta tas	28	200	1x10 ⁴	
118	FT	2	0,5	2-4	Termosta tas	25	200	1x10 ⁴	
430	FT	3	0,1	14	Termosta tas	24	200	0	
243	FT	1	0,5	3,5	Termosta tas	28	200	0	
500	FT	2	0,1	0,5	Termosta tas	30	160	0	Daug kristalų

<i>Daucus carota</i> spp. <i>sativus</i> , var. „Ieva“	370	FT	1	0,1	18	Termosta tas	22	100	0	Suardyta visa biomasė, daug priemaišų
--	-----	----	---	-----	----	--------------	----	-----	---	---------------------------------------

3.4. *Nicotiana tabacum* lapo disko transformacija ir augalo regeneracija

N. tabacum lapo disko transformacijoje buvo naudoti tabako mikroūglių lapai. Transformacijai atlikti vartotas *A. tumefaciens* kamienas GV3101. Eksperimento metu buvo naudoti du transformacijos protokolai. Atlikta po kelis bandymų pakartojimus pagal abi metodikas.

Pirmąjį transformacijos protokolą sudarė bakterijų paruošimo, eksplantų paruošimo, kokultivacijos ir bakterijų antibiotinio sunaikinimo etapai. Toliau transformuotas augalo eksplantas buvo regeneruojamas iki ūglio. Šio protokolo metodika paremta netiesioginės SE principais.

Tabako eksplantai buvo transformuojami ir toliau buvo vykdoma jų regeneracija. Kas kelias savaites eksplantai buvo persodinami ant naujos mitybinės terpės. Vizualiai buvo įvertinama jų būklė, stebimi pokyčiai – šie duomenys buvo fiksuojami nuotraukose (žr. 3.5. pav.).

Transformacijos efektyvumas buvo įvertintas į transformantų mitybinę terpę dedant kanamicino. Atsparumo kanamicinui genas buvo Ti-plazmidėje ir turėjo būti perneštas į augalo ląsteles kartu su tiksliniu genu. Transformacijai nepavykus, eksplantai turėtų sunykti selektyvioje terpėje.

Po 5 savaičių inkubacijos ant mitybinės terpės buvo pastebėtas lapo disko paaugimas. Taip pat užfiksuoti kai kurių eksplantų lapo audinio pokyčiai – šis savo tekstūra labiau priminė kalių, o ne lapo audinius. Eksplantų pakraščiai pradėjo ruduoti.

Po ~7 sav. buvo pastebėtos aplink eksplantus susidariusios agrobakterijų kolonijos. Šios buvo šalinamos prieš persodinimą eksplantus pakartotinai plaunant antibiotiniuose tirpaluose.

Po 9 sav. eksplantai toliau rudavo. Sunyko lapo disko struktūra, ši panašėjo į gumą, o nebe į kalių. Pastebėtas vėl agresyviai atsinaujinęs ir išplitęs agrobakterijų užkratas.

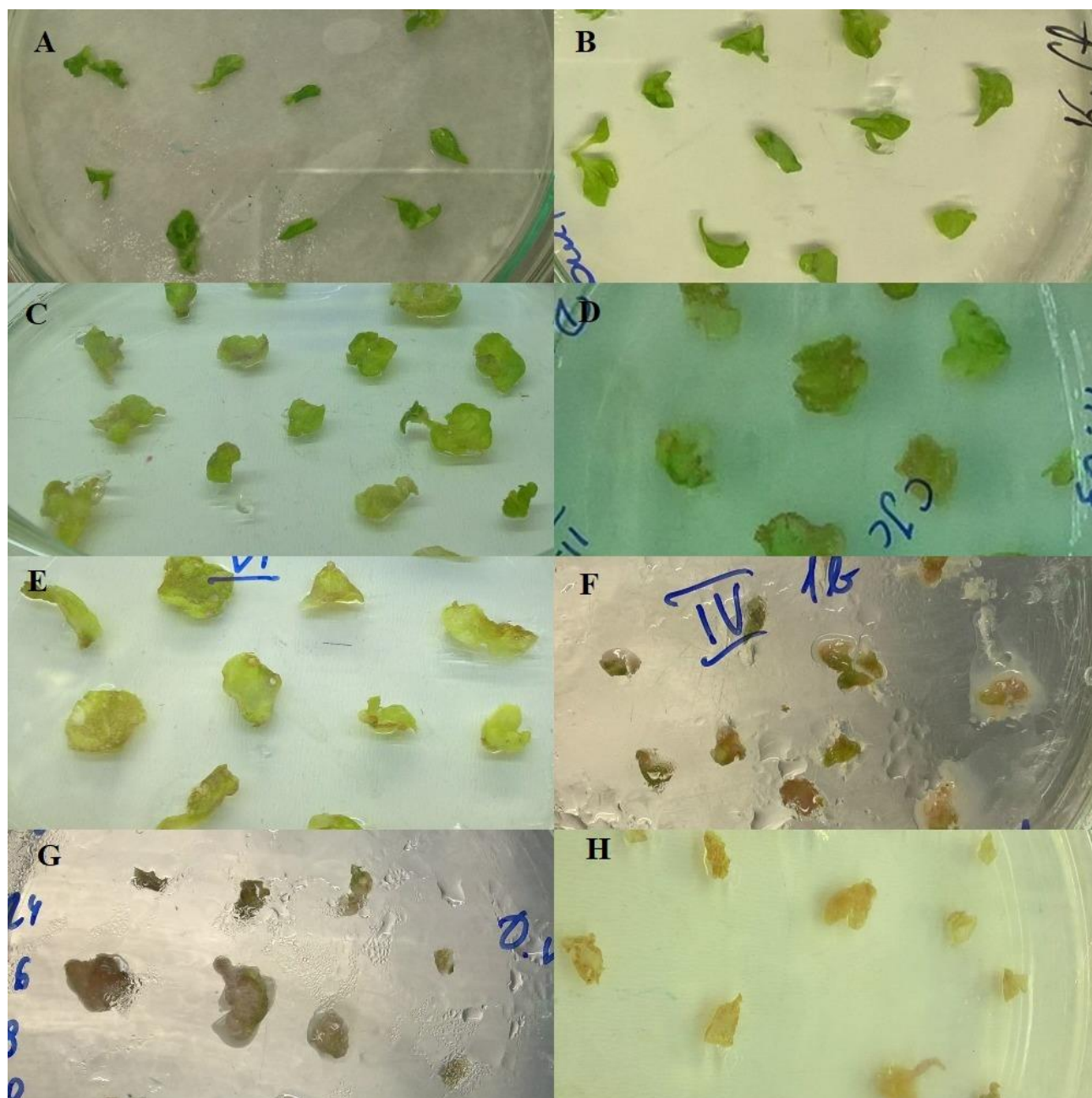
Per kelias likusias savaites toliau buvo bandoma sunaikinti išplitusias agrobakterijų kolonijas. Buvo manyta, kad galbūt bakterijos išvystė atsparumą terpėje esantiems antibiotikams (cefatoksimumi). Tačiau patikrinus antibiotikų veikimą skystoje LB terpėje auginoms *A. tumefaciens* bakterijoms, buvo nustatyta, kad agrobakterijos nėra atsparios minėtam antibiotikui.

Po 11 -sios inkubacijos savaitės šis bandymas buvo nutrauktas. Visi eksplantai buvo smarkiai užsikrėtę agrobakterijomis. Vizualūs eksplantų pokyčiai nurodė eksplantų gyvybingumo praradimą.

Kai kuriose lėkštelėse eksperimento eigoje buvo rastas ir pašalinis užkratas – pelėsinis grybas, bakterijos. Paveikti eksplantai buvo pašalinti iš tolimesnio tyrimo.

Pakartotinai nepavykus tabako lapo disko transformacijai naudojant pirmąjį protokolą, buvo nuspręsta pabandyti alternatyvius metodus. Kadangi tyrimuose dažniausiai naudojami skirtingi

agrobakterijų kamienai ir skirtingi plazmidžių konstruktai, reikia manyti, kad protokolo modifikacijų būtinybė iškyla beveik visada.

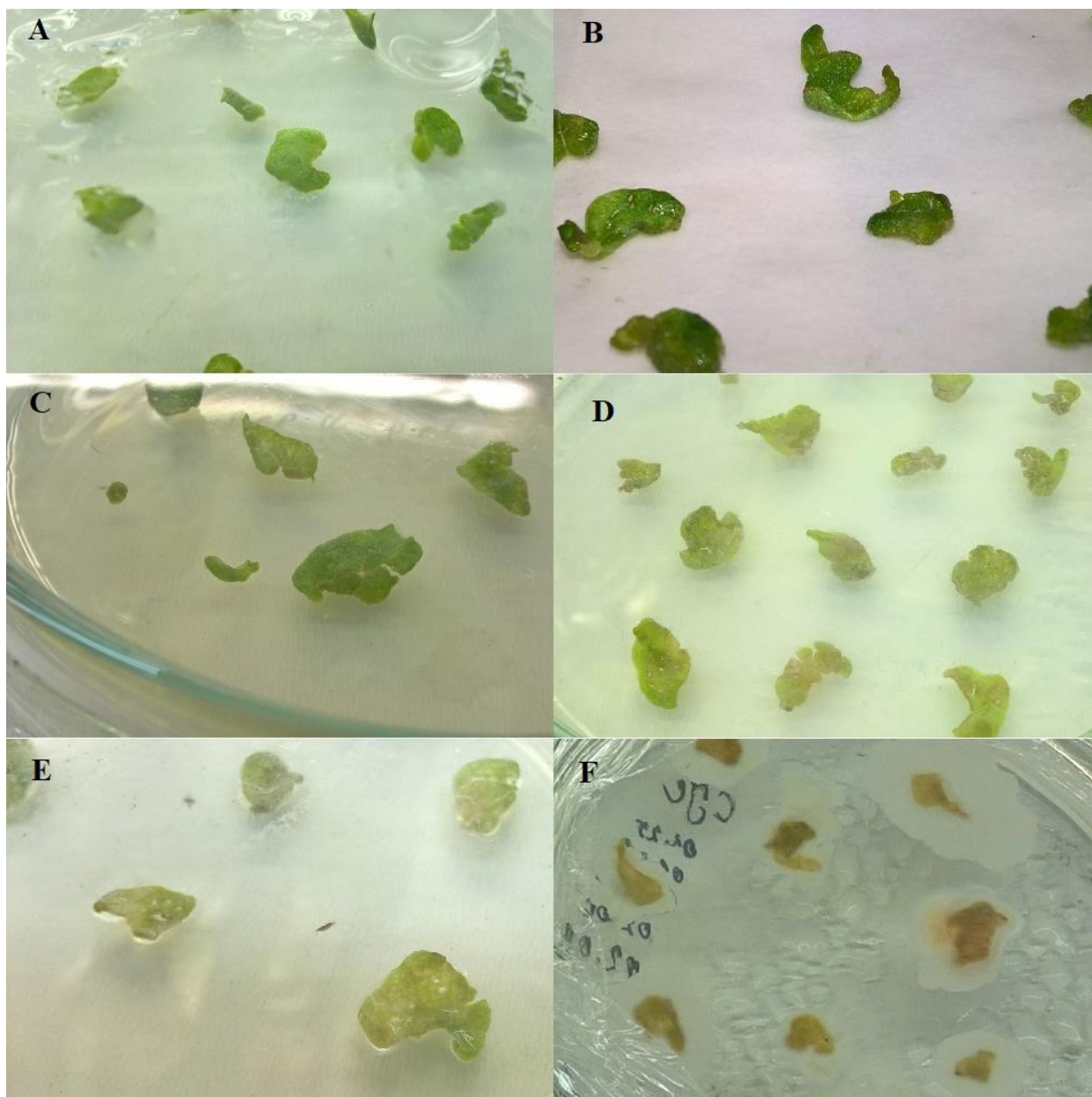


3.5. pav. Transformuotų tabako eksplantų regeneracijos procesas transformacijai naudojant pirmąjį protokolą: A – kokultivacija, B-H – inkubacija. Inkubacijos trukmė: B – 1 d., C – 2 sav., D – 5 sav., E – 7,5 sav., F – 9 sav., G – 10 sav., H – 11 sav. (autorės nuotrauka).

Antrasis protokolą nuo pirmojo specifiskai išsiskyrė savo pirmu etapu. Dvi savaites prieš atliekant transformaciją, augalų eksplantai buvo auginami siekiant pradinės eksplanto regeneracijos. Šis metodas veikia tiesioginės SE principu.

Po pirminės eksplantų kultivacijos tabako lapo diskai buvo transformuojami ir toliau buvo vykdoma jų regeneracija. Kas savaitę eksplantai buvo persodinami ant naujos mitybinės terpės. Vizualiai buvo įvertinama jų būklė, stebimi pokyčiai – šie duomenys buvo fiksuojami nuotraukose (žr. 3.6. pav.).

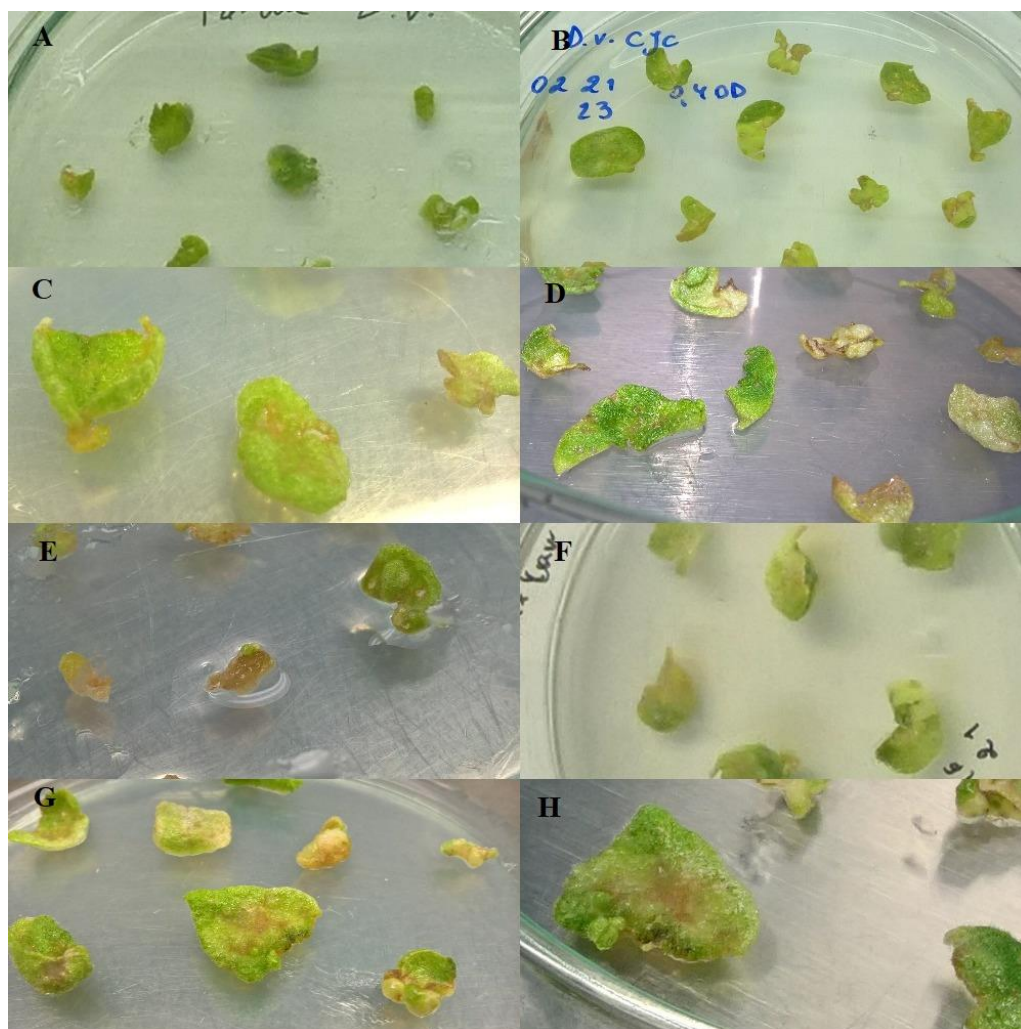
Iš karto po pirminės eksplantų kultivacijos buvo galima pastebėti lapo disko audinio pokyčius. Audiniai labiau priminė kaliaus darinius. Taip pat nustatytas lapo diskų padidėjimas.



3.6. pav. Transformuotų tabako eksplantų regeneracijos procesas transformacijai naudojant antrąjį protokolą: A – eksplantų kultivacija, B – kokultivacija, o C-F – inkubacija. Inkubacijos trukmė: C – 3 d., D – 1 sav., E – 2 sav., F – 3 sav. (autorės nuotrauka).

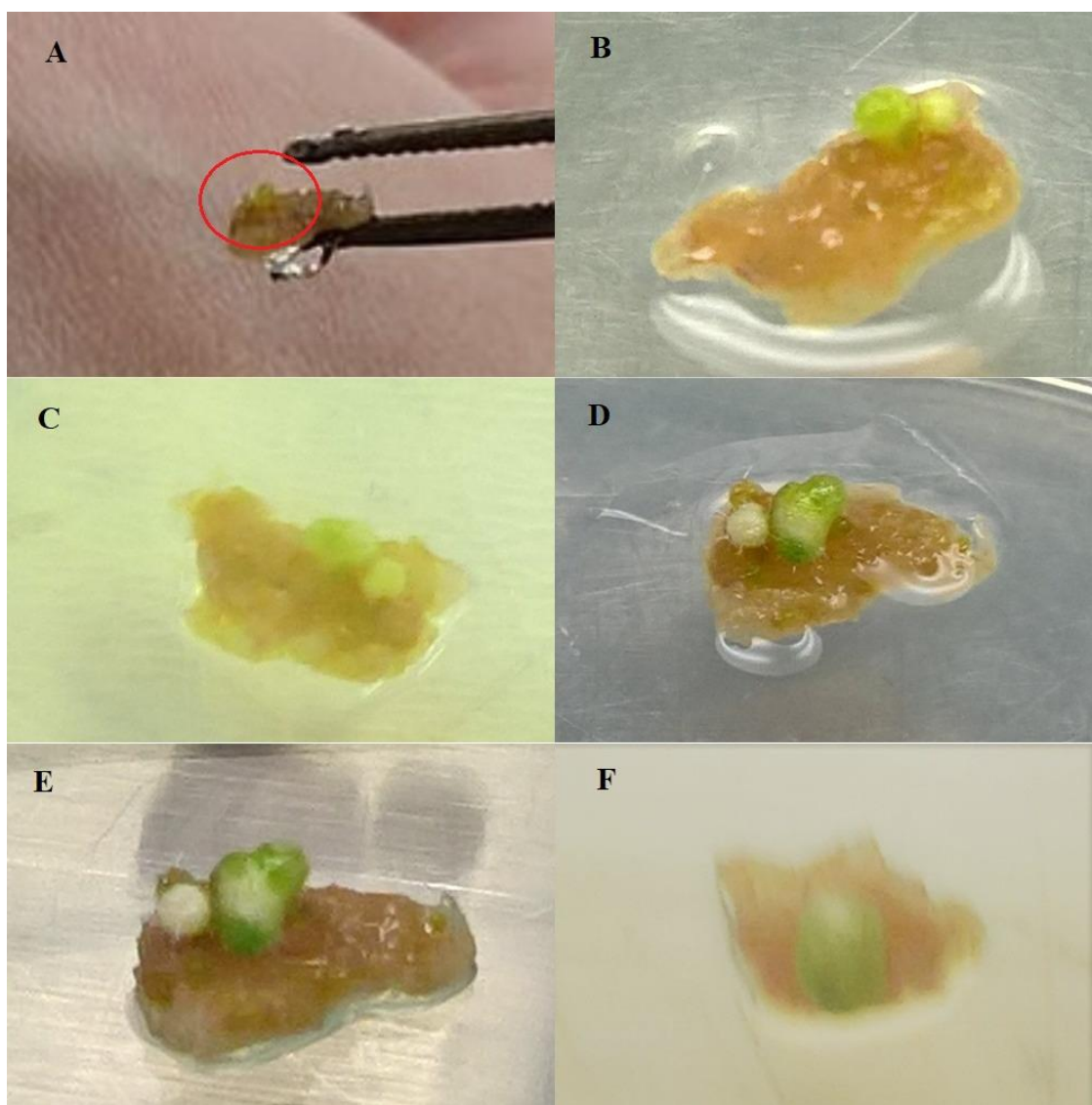
Po pirmosios inkubacijos savaitės ant terpės paviršiaus buvo pastebėtas ekstensyvus agrobakterijų kolonijų augimas. Jis buvo sustabdytas naudojant antibiotinius tirpalus. Po dviejų savaitių inkubacijos pastebėti eksplantų pokyčiai: dalis jų pradėjo ruduoti, vėl užfiksuotas agrobakterijų augimas. Trečią savaitę terpėje agrobakterijų augimas vėl suintensyvėjo, eksplantai buvo praradę savo žalią spalvą, jų struktūra ir išvaizda pasikeitė. Buvo nuspręsta bandymą nutraukti, kadangi vizualiai eksplantai nebeatrodė gyvybingi.

Kadangi pagrindinė eksplantų žūtis priežastis naudojant abi transformacijos metodikas buvo itin agresyvus, į antibiotikus minimaliai reaguojantis, agrobakterijų užkratas, buvo nuspręsta tolimesnius transformacijos bandymus atlikti naudojant mažesnes agrobakterijų koncentracijas nei anksčiau (žr. 3.7. pav.).

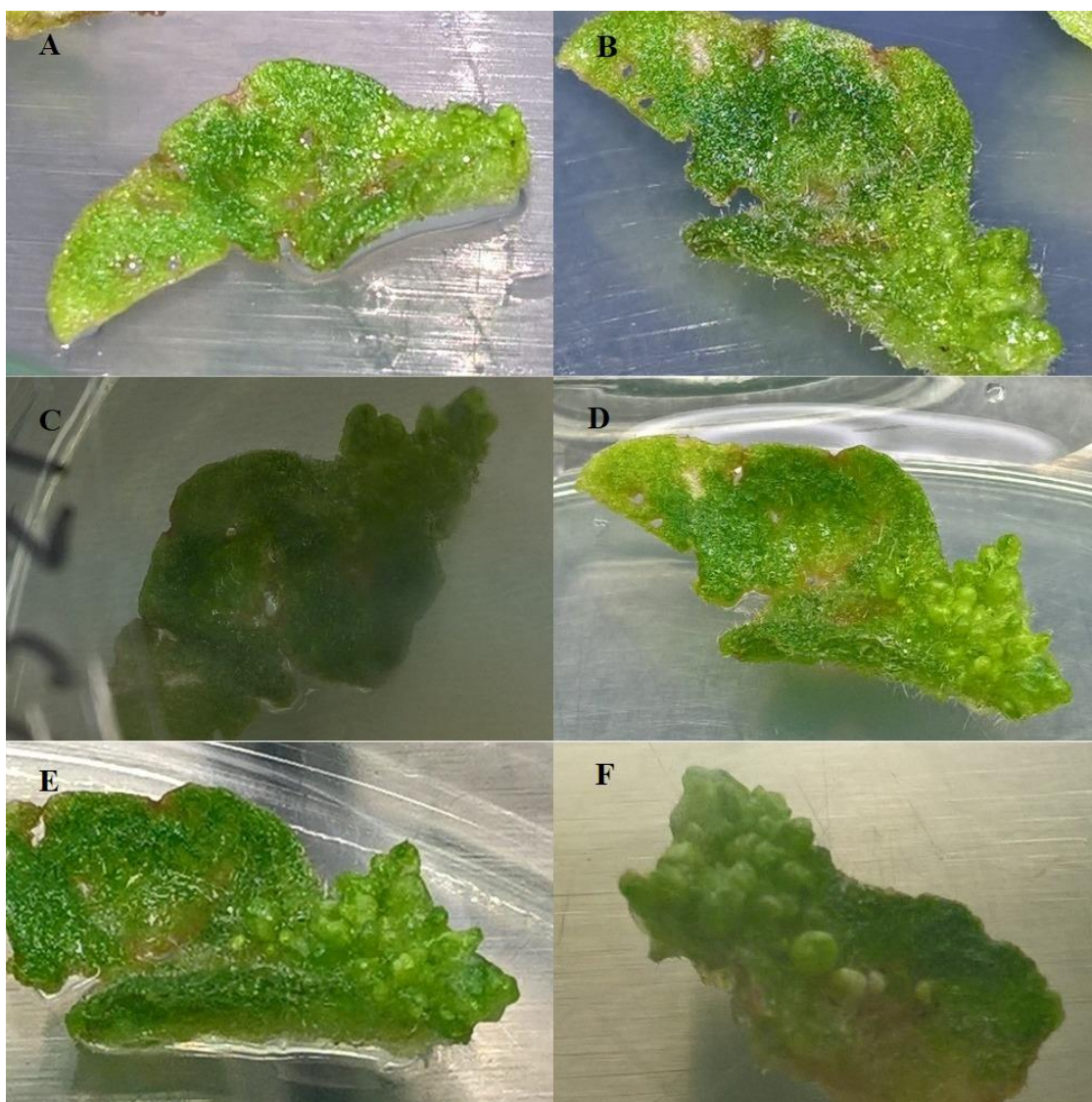


3.7. pav. Transformuotų tabako eksplantų regeneracijos procesas transformacijai naudojant antrąjį protokolą su mažesniu agrobakterijų kiekiu: A – eksplantų kultivacija, B-H – inkubacija. Inkubacijos trukmė: B – 2 d., C – 1 sav., D – 2 sav., E – 3 sav., F – 4 sav., G – 5 sav., H – 6 sav. (autorės nuotrauka).

Šis metodo pakeitimas pasirodė efektyvus. Jau po trečios eksplantų inkubacijos savaitės buvo pastebėti tabako ūglių regeneracijos požymiai. Dauguma regeneruojančių eksplantų suformavo po du regeneracijos židinius (žr. 3.8. pav.), tačiau pasitaikė ir eksplantų su daugybiniais židiniais (žr. 3.9. pav.). Per kelias tolimesnes savaites regeneruojantys ūgliai toliau augo, susidarė nauji regeneracijos židiniai. Tačiau kai kurie eksplantai sunyko ir buvo pašalinti iš mitybinės terpės. Agrobakterijų augimas nepastebėtas viso tolimesnio regeneracijos proceso metu.



3.8. pav. Transformuotas tabako eksplantas su dvejais regeneracijos židiniais. Regeneracija 3 – 8 savaitėmis (A – F atitinkamai) (autorės nuotrauka).



3.9. pav. Transformuotas tabako eksplantas su daugybiniais regeneracijos židiniaiis. Regeneracija 3 – 8 savaitėmis (A – F atitinkamai) (autorės nuotrauka).

Pirmasis lapo disko transformacijos metodas nuo antrojo skyrėsi nežymiai, tačiau verta paminėti, kad antrajame protokole buvo naudotas antibiotikas timentinas vietoje pirmajame protokole naudoto cefatoksimo. Antrajame protokole taip pat buvo naudoti kitokie fitohormonai. Fitohormonai buvo į terpę įdėti skirtingu metu. Antrasis protokolas buvo pritaikytas pagal Pahti, Tula ir Tuteja publikaciją [46].

Kitų autorių darbuose dažnai minima, kad lapo disko transformacija yra sąlyginai nesudėtingas ir efektyvus metodas, tačiau augalo regeneracija užtrunka ilgai [44, 45, 57]. Šiame eksperimente, kaip ir minėtuose straipsniuose, pastebėta, kad ūglių regeneracija yra ilgas procesas. Pirminiai regeneracijos židiniai pasirodė tik naudojant antrąjį protokolą po trijų savaičių inkubacijos. Straipsnyje, pagal kurį šis protokolas buvo sukurtas minima regeneracijos iki besišaknijančių ūglių

trukmė buvo ~3 mėnesiai. Anot autorių, pirminiai somatiniai embrionai susidarė po maždaug mėnesio inkubacijos [46].

Antrajame naudotame protokole buvo darytas vienas esminis pakeitimas lyginant su protokolu aprašytu straipsnyje. Buvo žymiai sumažintas agrobakterijų kiekis naudotas transformacijoje. Tipiškai lapo disko transformacijos protokoluose minima agrobakterijų koncentracija yra tarp 0,6 ir 0,8 OD₆₀₀, o kartais net didesnė [44, 46]. Kaip anksčiau minėta, šio eksperimento metu buvo susidurta su atsinaujinančiu agrobakterijų užkratu selektyvioje terpėje, tad buvo nuspręsta transformacijoje naudojamų agrobakterijų koncentraciją sumažinti iki 0,2-0,4 OD₆₀₀.

Straipsniuose rašoma, kad regeneracijos židiniai atsiranda ant lapo disko kraštų arba vietose kur lapo diskas buvo pažeistas [44, 78]. Šio eksperimento metu taip pat buvo pastebėta, kad somatiniai gemalai daugiausia susiformuoja iš eksplanto pakraščių arba vietose, kur pagal protokolą lapo diskas buvo pažeistas adata.

Transformacijai labai svarbu yra tinkamai pasirinkti *A. tumefaciens* kamieną. Darant eksperimentus mokslininkų grupė pastebėjo, kad tam tikri kamieniai yra efektyvesni, tačiau juos galibūti sunkiau pašalinti iš regeneracinės terpės. Autoriai taip pat pamini eksplantų regeneracinį periodą prieš transformaciją, tačiau jų darbuose šis žingsnis buvo nebūtinai, nes procesas buvo efektyvus ir be jo [44].

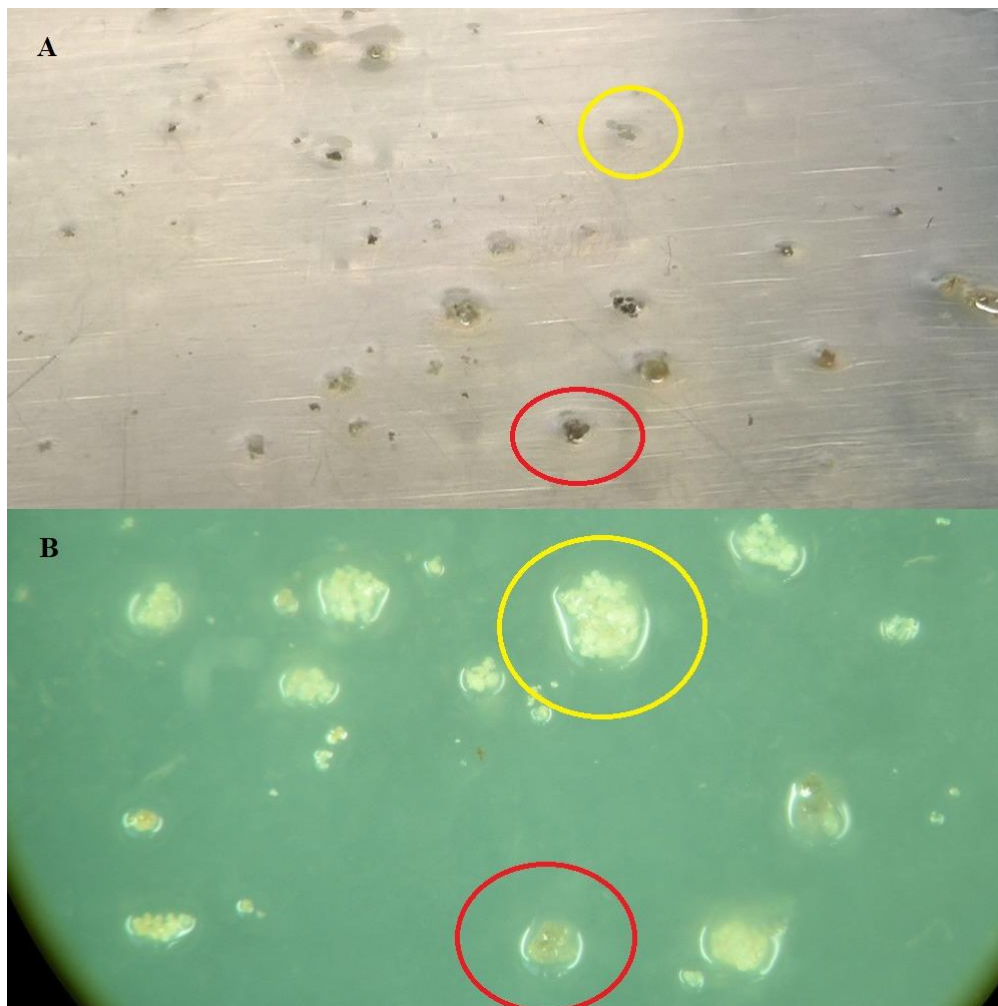
Sunilkumar ir kt. straipsnyje aprašoma tabako lapo disko auginimas ant agarizuotos mitybinės terpės prieš juos transformuojant. Autorių bandymai buvo paremti literatūriniais duomenimis, kurie rodė padidėjusį transformacijos efektyvumą atliekant papildomą eksplanto regeneraciją kituose augaluose. Aprašyto bandymo metu buvo nustatyta, kad šis etapas padidina agrobakterijų *vir* genų indukciją, tokiu būdu padidindamas ir sėkmingos T-DNR pernašos tikimybę ir transformuotų augalų susidarymą [79].

Mokslininkų darbuose taip pat galima aptikti informacijos apie regeneracijos periodu naudojamos mitybinės terpės svarbą augalo somatinių embrionų susidarymui ir brendimui. Tam itin daug įtakos turi naudojami fitohormonai ir jų kiekis terpėje. Nagrinėto straipsnio duomenys rodo, kad geriausi rezultatai su *N. tabacum* rūšimi pasiekiami naudojant ~10 kartų daugiau citokinino nei auksino (2,5 mg/l ir 0,2 mg/l atitinkamai) [46]. Šio bandymo metu taip pat buvo laikytasi šio fitohormonų santykio.

3.5. *Daucus carota* suspensijos transformacija

Daucus carota ssp. *sativus* ląstelių suspensija buvo transformuota *A. tumefaciens* bakterijomis (kamienas GV3101). Protokolas buvo pritaikytas morkoms iš 2004 -ųjų metų straipsnio [47].

Morkos ląstelių suspensija buvo transformuota ir toliau buvo vykdoma kalių regeneracija. Svarbu paminėti, kad transformacijos efektyvumui padidinti į kokultivacijos terpę buvo dėta AS. Kaliaus regeneracija truko ilgai. Akimi įžiūrimi kaliai susidarė po maždaug mėnesio inkubacijos tamsoje. Nuotraukoje matomi dariniai užfiksuoti po beveik dviejų mėnesių inkubacijos (žr. 3.10. pav.). Po dviejų mėnesių buvo galima lengvai atskirti kalius bei įvertinti jų būklę.



3.10. pav. Morkų suspensijos formavimasis į kalius ant selektyvios terpės su kanamicinu po transformacijos agrobakterijomis. A – vaizdas be padidinimo, B – 5x padidinimas. Geltonai pažymėti kaliai yra gyvybingi, o raudonai pažymėti kaliai yra praradę gyvybingumą (autorės nuotrauka).

Bandymo metu buvo pastebėta, kad kai kurie dariniai pradėjo keisti spalvą, ruduoti bei nustojo augti. Tikėtina, kad tokie jų pokyčiai rodo kaliaus regeneracinių savybių praradimą. Atsinaujinęs

agrobakterijų užkratas buvo užfiksuotas 5 % visų lėkštelių. Tai rodo, kad bakterijos buvo sėkmingai sunaikintos antibiotikais.

Transformacijos efektyvumas buvo įvertintas į transformantų mitybinę terpę dedant kanamicino. Atsparumo kanamicinui genas buvo Ti-plazmidėje ir turėjo būti perneštas į augalo ląsteles kartu su tiksliniu genu. Transformacijai nepavykus, nesėkmingai transformuoti eksplantai sunyko selektyvioje terpėje.

Straipsnyje, iš kurio buvo pritaikytas ląstelių suspensijos transformacijos protokolas, rašoma, kad tirti transformantai suformavo kalius po maždaug trijų savaitių. Visgi aprašomame eksperimente buvo naudotos vairo ląstelių suspensijos, tad rezultatus galima lyginti tik paviršutiniškai [47].

Forreiter ir kt. straipsnyje aprašoma vairo ląstelių suspensijos transformacija agrobakterijomis įterpiant jonvabalio liuciferazės geną. Darbe minima, kad efektyviai transformacijai pasiekti itin svarbi yra kokultivacijos etapo trukmė. Pasak autorių, transformacija buvo efektyviausia po 48 h trukusios kokultivacijos. Iki to laiko efektyvumas didėjo, o vėliau iki eksperimento galo (72 h) svyravo kaip manoma dėl sumažėjusio ląstelių gyvybingumo [49]. Šio bandymo metu kokultivacinis periodas taip pat truko apie 48 h.

Wu ir kt. darbe minima, kad itin svarbus yra transformantų selekcijos etapas. Tam jie į miežių suspensijos ląsteles įterpė genus, kurių raišką būtų lengva vizualiai užfiksuoti. Autoriai kokultivacijos etape naudojo AS, tačiau lyginant su kontrole nebuvo pastebėtas reikšmingas transformacijos efektyvumo padidėjimas. Tyrėjai bandymo metu pastebėjo, kad daug didesnę įtaką transformacijos efektyvumui turėjo naudotas agrobakterijų kamienas. Augalų veislė ar suspensijos ląstelių motininio audinio tipas jų atliktame bandyme neturėjo reikšmės [34].

Eksperimento metu susiformavę kaliai po 1,5 mėnesio inkubacijos tamsoje buvo perkelti į skystą mitybinę terpę ir toliau buvo kultivuojama jų ląstelių suspesija.

3.6. *Daucus carota* hipokotilių transformacija ir kaliaus regeneracija

Daucus carota ssp. *sativus* hipokotiliai buvo transformuoti *A. tumefaciens* bakterijomis (kamienas GV3101) ir toliau buvo vykdoma kalių regeneracija. Bandymo metu nebuvo užfiksuotas agrobakterijų užkratas. Kaliaus regeneracija truko 6 savaites. Po to kaliai buvo naudoti tolimesnei analizei, o dalis jų buvo palikta augti toliau. Inkubacija vyko tamsoje kambario temperatūroje. Nuotraukoje matomi dariniai užfiksuoti po ~4 savaitių inkubacijos (žr. 3.11. pav.). Transformacijos efektyvumas buvo įvertintas transformantų mitybinę terpę papildant kanamicinu.



3.11. pav. Morkų hipokotiliai po ~4 savaičių inkubacijos (autorės iliustracija).

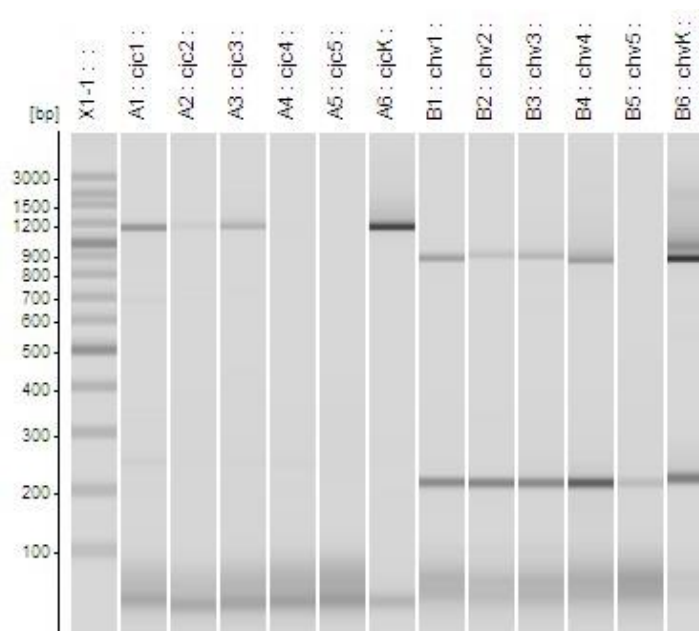
3.7. *Daucus carota* transformuotų hipokotilių įvertinimas

Po 6 savaičių transformacijos sėkmingumo patikrinimui, iš penkių atsitiktinai atrinktų morkos hipokotilių kalių buvo išskirta DNR. Buvo nustatyta DNR koncentracija ir jos grynumas (žr. 3.4. lentelė).

3.4. lentelė. *Daucus carota* hipokotilių DNR išskyrimo rezultatai.

Mėginio nr.	DNR koncentracija, ng/μl	DNR grynumas, A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	268	2,184
2	202	2,077
3	163	1,512
4	245	1,922
5	468	1,851

Visi mėginiai buvo pakankamai švarūs tolimesnei PGR amplifikacijai atlikti. PGR buvo daryta naudojant pradmenis skirtus tikslinio geno atpažinimui ir pradmenis skirtus agrobakterijų virulentiškumo genui atpažinti. Po PGR buvo atlikta kapiliarinė elektroforezė (žr. 3.12. pav.). Šis transformantų patikros metodas plačiai taikomas tiriant transgeninius organizmus [52, 53].



3.12. pav. *Daucus carota* hipokotilių kalių DNR analizė kapiliarinės elektroforezės metodu. X1 – standartas, A1-A5 – mėginiai su pradmenimis tiksliniam genui atpažinti, B1-B5 – mėginiai su pradmenimis agrobakterijų *vir* genui atpažinti, A6 ir B6 – kontroliniai mėginiai tiksliniam genui ir *vir* genui atitinkamai (autorės iliustracija).

Elektroforezės rezultatai rodo, kad A1-A3 mėginiuose buvo aptikta tikslinį peptidą koduojanti seka (~1200 bp), o B1-B4 mėginiuose aptikta *vir* geno seka, kuri pagal literatūrinius duomenis yra 898 bp ilgio (Yang, et al. 2013). ~200 bp fragmentai yra nespecifiniai produktai. Tikėtina, jog tai susijungusių pradmenų dimerai, kurie dėl elektroforezės ypatumų atrodo didesni.

1-3 mėginiuose buvo aptiktos ir tikslinį peptidą koduojančios sekos ir virulentiškumo geno sekos. Tikėtina, kad morkų hipokotilių transformacija buvo sėkminga, tačiau ant kalių buvo likę ir prislopintų agrobakterijų, kurios neišaugino matomų kolonijų, tačiau ir nesunyko antibiotinėje aplinkoje. Agrobakterijų binarinės plazmidės turėjo ir atsparumo kanamicinui geną. Teoriškai, jei transformantas nesunyko ant selektyvios terpės su kanamicinu, transformacija yra sėkminga [53, 81].

4. REKOMENDACIJOS

Šio tyrimo metu buvo susidurta su daugeliu nenumatytų sunkumų. Nesklandumai buvo užfiksuoti tabako ir morkų protoplastų išskyrimo metu, transformuojant tabako lapo diskus ir juos toliau regeneruojant bei transformuojant morkų ląstelių suspensiją ir regeneruojant kalius iš jos.

N. tabacum protoplastų išskyrimo iš mikroūglių protokolas buvo pakartotinai modifikuotas. Visi atlikti bandymai nedavė pageidautinos protoplastų koncentracijos transformacijai atlikti, tad vykdant tolimesnius tyrimus reikėtų optimizuoti protoplastų išskyrimo protokolą. Siekiant geriausių rezultatų, tikslinga būtų atlikti specifinių parametru kalibracinius bandymus. Reikėtų nustatyti optimalias terpių sudėtis, fermentų kiekius, inkubacijos temperatūrą, trukmę bei metodą, optimalų reikalingos biomasės kiekį. Reikėtų atsižvelgti į augalų auginimo sąlygas *in vitro*, taip pat į jų amžių ir netgi jų užkrėstumą endofitais. Taip pat, kaip minėta anksčiau, maža protoplastų koncentracija matavimo metu gali būti užfiksuota ne dėl netinkamos išskyrimo metodikos, bet dėl to, kad didelė išskirtų protoplastų dalis yra prarandama plovimo etapuose. Norint užtikrinti, kad išskirti protoplastai nėra pašalinami su supernatantu plovimo metu reikėtų atlikti supernatanto frakcijų analizę mikroskopuojant.

Norint išskirti protoplastus iš *D. carota* kaliaus reikėtų atlikti analogiškus plataus spektro tyrimus, kadangi šio tyrimo metu šie augalai nebuvo taip plačiai tyrinėti kaip *N. tabacum*. Atsižvelgiant į nagrinėtus literatūrinius duomenis, išskiriant protoplastus iš morkos, optimaliausia būtų pasirinkti kitą bandymo objektą, pavyzdžiui ląstelių suspensijas.

Atliekant tabako lapo disko transformaciją taip pat buvo susidurta su tam tikrais nesklandumais. Bandymu metu buvo pastebėta, kad transformacijoje naudotos agrobakterijos yra sunkiai pašalinamos nuo augalo eksplantų, taip žymiai sumažindamos jų gyvybingumą. Ši problema buvo išspręsta pakartotinose transformacijose naudojant mažesnes *A. tumefaciens* koncentracijas arba pakeitus naudotą antibiotiką. Ateityje reikėtų atlikti kalibracinius bandymus optimaliai bakterijų koncentracijai nustatyti. Literatūroje buvo aptikta duomenų teigiančių, kad kai kurie agrobakterijų kamienai pasižymi didesniu infekciniu potencialu, tad tikslinga būtų atlikti paralelinius bandymus su keliais skirtingais kamienais bei atlikti bandymus naudojant kelis skirtingus antibiotikus.

Lapo disko transformantų regeneracija iki besišaknijančių ūglių taip pat galėtų būti optimizuota. Reikėtų nustatyti optimalias fitohormonų koncentracijas regeneracinėse terpėse. Tam naudingi būtų kalibraciniai bandymai.

Dirbant su morkų ląstelių suspensijomis, didžiausias metodo trūkumas buvo itin lėtas kaliaus augimas lyginant su regeneracijos trukmėmis aprašytais literatūroje. Tad reikėtų optimizuoti šį procesą, t.y. keisti regeneracinių terpių sudėtis, inkubacijos parametrus.

Dirbant su morkų hipokotiliais reikėtų optimizuoti transformacijos efektyvumą ir nustatyti efektyvesnius metodus agrobaterijoms pašalinti nuo susiformavusio kalius. Tai sumažintų netikslumus, atsirandančius transformacijos patikros metu.

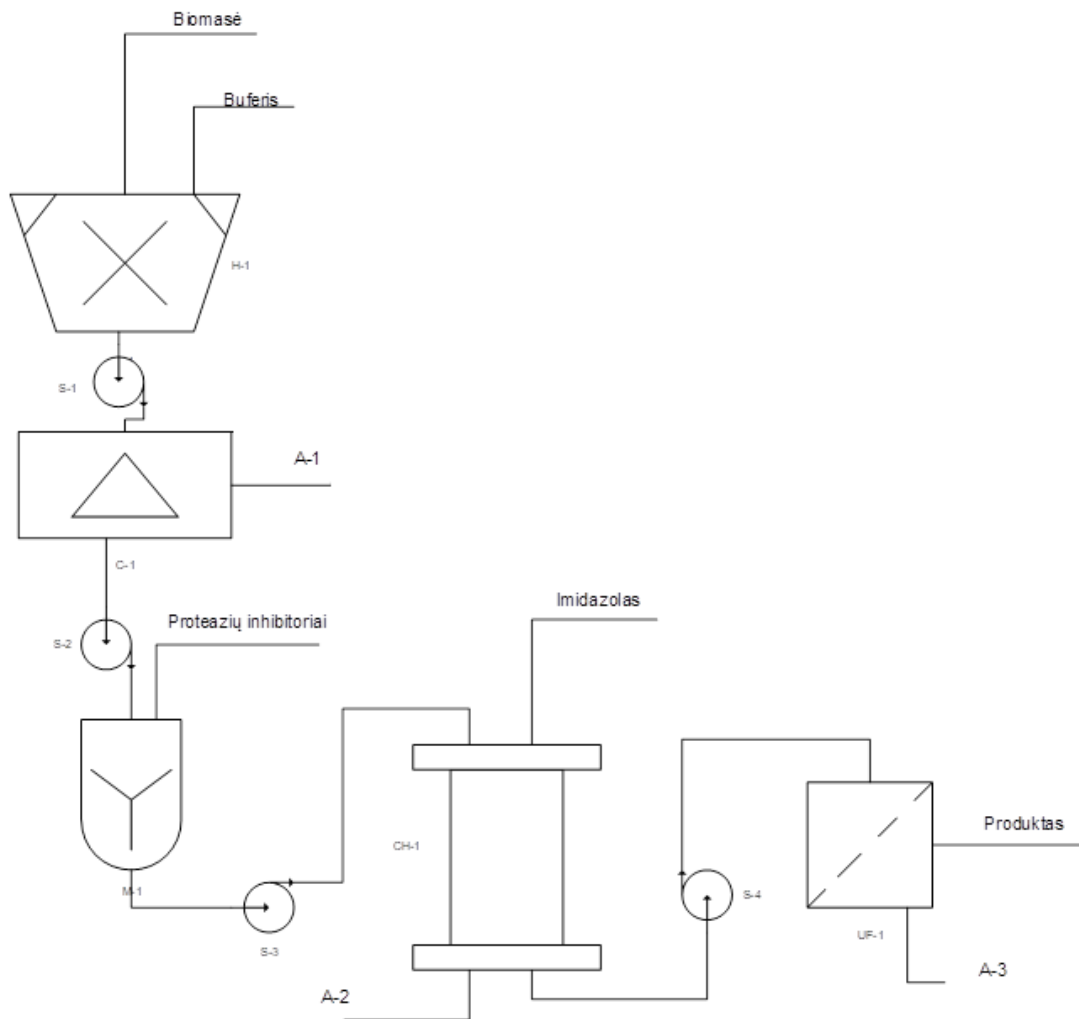
Kadangi tyrimo metu naudoti protokolai yra tobulintini, jų optimizavimo metu, norint pagreitinti šį procesą, reikėtų naudoti lengvai identifikuojamų požymių genus. Tam tiktų GFP ar analogiškos prigimties genas.

Apibendrinant, galima teigti, kad šio tyrimo metu gauti rezultatai leidžia aiškiai išskirti optimizuotinas metodikos sritis.

Atliekant tolimesnius bandymus planuojama susitelkti į homozigotinių dominantinių linijų pagal pageidautiną alelį sukūrimą. Bus siekiama sukurti *N. tabacum* ir *D. carota* veisles, pasižyminčias ilgalaikę EM imituojančio chimerinio peptido raišką.

Norint sukurti naują transgeninių augalų veislę pirmiausia reikėtų kultivuoti regeneruotus augalus iki žydėjimo ir sėklų gavimo. Šios sėklos ilgainiui galėtų būti padaugintos iki pakankamo kiekio, leidžiančio augalus auginti dideliu mastu. Tolimesni darbai susidėtų iš augalų kultivavimo, biomasės apdirbimo ir tikslinio baltymo gryninimo. Ilgainiui aptarti metodai duotų pradžią plataus masto pramonei chimerinio peptido gamybai pasitelkiant augalų molekulinio ūkininkavimo principus. Atlikus literatūrinę analizę yra pateikiama tikėtina biotechnologinio produkto gamybos aparatūrinė schema [82] (žr. 4.1. pav.).

Analogiškai transgeninėms augalų vesilėms galima sukurti ir transgenines ląstelių suspensijų linijas. Šios pramoniniu būdu gali būti kultivuojamos panašiai kaip bakterijos fermentatoriuose.



4.1. pav. Tikėtina preliminarinė principinė biotechnologinio produkto gamybos aparatūrinė schema (autorės iliustracija).

Verta paminėti, kad priklausomai nuo esamų aplinkos sąlygų ir valstybinių reglamentų, augalai gali būti auginami ir natūraliomis sąlygomis lauke, ir steriliose patalpose. Tai gali daryti įtaką pirminiams biotechnologinio produkto gaminimo etapams, t.y. lauke augintus augalus gali tekti sterilizuoti siekiant išvengti įvairių patogenų.

Surinkta biomasa yra homogenizuojama su buferiu (1:5) homogenizatoriuje (H-1). Po to homogenizatas išcentrinis siurbliu (S-1) paduodamas į centrifuga (C-1). Čia homogenizatas centrifuguojamas siekiant atskirti kietas mišinio daleles ir skystį. Kietos dalelės ir priemaišos pašalinamos iš mišinio (A-1), o supernatantas toliau išcentrinis siurbliu (S-2) pernešamas į maišyklę (M-1). Maišyklėje supernatantas maišomas su proteazių inhibitoriais siekiant pašalinti kenksmingą proteazių poveikį produktui. Iš maišyklės mišinys toliau išcentrinis siurbliu (S-3) paduodamas į chromatografinę kolonėlę (CH-1). Čia remiantis giminingumo chromatografijos principais ir

chelacijos metodu naudojant histidino žymę iš mišinio išskiriamas tikslinis baltymas. Iš kolonėlės pašalinamos priemaišos (A-2), o po to kolonėlė išplaunama naudojant imidazolą. Tokiu būdu nuo kolonėlės elementų atskiriamas produktas. Šis mišinys toliau išcentrinu siurbliu (S-4) paduodamas į ultrafiltracinę sistemą (UF-1). Čia produktas išvalomas nuo priemaišų, kurios pašalinamos (A-3) ir sukonzentruojamas. Po šio žingsnio produktas išskiriamas ir sandeliuojamas -80 °C temperatūroje.

Svarbu paminėti, kad visas gamybinis procesas turėtų būti aušinamas, taip siekiant išvengti tikslinio baltymo denatūracijos. Proceso metu turėtų būti palaikoma bent +4 °C temperatūra.

Pateikta schema yra tik rekomendacinio pobūdžio, kadangi daugelis papildomų produkto gryninimo etapų priklauso nuo specifinio baltymo bei transgeninio augalo savybių. Tikėtina, kad šiuo atveju gali tekti papildomai valyti mišinį nuo fenolinių ir alkaloidinių junginių. Literatūroje rašoma, kad būtent šios medžiagos bei proteazės padaro daugiausia žalos galutiniam baltymo produktui [82].

IŠVADOS

1. Tyrimo metu buvo sukurtas binarinės sistemos vektorius, nešantis chimerinio peptido geną. Vektorius buvo sukonstruotas naudojant „GoldenBraid 3.0” daugianario surinkimo reakciją ir padaugintas *E. coli* ląstelėse. Bakterijų transformacija buvo įvertinta naudojant α -komplementacijos sistemą.

2. Tyrimo eigoje buvo sukurta *Agrobacterium tumefaciens* bakterija, nešanti Ti-plazmidę su tiksliniu genu. Tam buvo naudotas domestikuotas agrobakterijų kamienas GV3101 (pMP90). Binarinis vektorius į bakterijas buvo perkeltas elektroporacijos metodu. Agrobakterijų transformacija buvo įvertinta atlikus kolonijų PGR, analizei naudojant kapiliarinės elektroforezės metodą.

3. Chimerinio peptido seką koduojantis genas buvo įterptas į *Nicotiana tabacum* ir *Daucus carota* augalines raiškos sistemas. Geno pernašai buvo naudojamos anksčiau sukurtos agrobakterijos. Tabako lapo disko ir morkų ląstelių suspensijos ir hipokotilių transformacija buvo patikrinta transformantus auginant ant selektyvios terpės su kanamicinu. Morkų hipokotilių transformacija buvo įvertinta atlikus PGR bei kapiliarinės elektroforezės analizę.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Heidaran, M. A. Tissue engineering: a biological solution for tissue damage, loss or end stage organ failure. *Iranian Biomedical Journal*, 2000, 1-5 p.
2. Kaushik, G., Leuten, J. ir Khademhosseini, A. Concise review. Organ engineering: design, technology and integration. *Stem Cells*, 2017, 51-60 p. DOI: 10.1002/stem.2502
3. Tallawi, M et al. Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *Interface*, 2015. DOI: 10.1098/rsif.2015.0254
4. Barker, T. H. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behaviour in regenerative medicine. *Biomaterials*, 2011, 4211-14 p. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.027
5. Daamen, W. F. et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, 2007, 4378-98 p. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.025
6. Chen, Q. ir Davis, K. R. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Research*, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.8010.1
7. Yao, J. et al. Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 28549-65 p. DOI: 10.3390/ijms161226122
8. Matoba, N., Davis, K. R. ir Palmer, K. E. Recombinant protein expression in Nicotiana. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 199-219 p. DOI: 10.1007/978-1-61737-957-4_11
9. Rojas-Anaya, E. et al. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Research*, 2009, 911-9 p. DOI: 10.1007/s11248-009-9278-8
10. Gallie, D. R. Transgenic Carrot (*Daucus carota* L.). *Transgenic Crops II*, 2001, 147-58 p. DOI: 10.1007/978-3-642-56901-2_11
11. Yoshito, Y. Challenges in tissue engineering. *Interface*, 2006, 589-601 p. DOI: 10.1098/rsif.2006.0124
12. Tao, Y. et al. Heparin nanomodification improves biocompatibility and biomechanical stability of decellularized vascular scaffolds. *International Journal of Nanomedicine*, 2012. 5847-58 p. DOI: 10.2147/IJN.S37113
13. Aumailley, M. The laminin family. *Cell Adhesion and Migration*, 2013, 48-55 p. DOI: 10.4161/cam.22826
14. McDevitt, T. et al. In vitro generation of differentiated cardiac myofibers on micropatterned laminin surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 472-9 p. PMID: 11920672
15. McDevitt, T. C. et al. Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair. *Journal of Biomedical Materials Research* 2003, 586-95 p. DOI: 10.1002/jbm.a.10504

16. Domogatskaya, A. et al. Laminin-511 but not -332, -111, or -411 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro. *Stem cells*, 2008, 2800-9 p. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0389
17. Miyazaki, T. et al. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 27-32 p. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.07.111
18. Sasaki, T. et al. Domain IV of mouse laminin beta1 and beta2 chains. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 431-42 p. PMID: 11856301
19. Boateng, S. Y. et al. RGD and YIGSR synthetic peptides facilitate cellular adhesion identical to that of laminin and fibronectin but alter the physiology of neonatal cardiac myocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2005, 30-8 p. DOI: 10.1152/ajpcell.00199.2004
20. Choi, S. et al. Effects of various extracellular matrix proteins on the growth of HL-1 cardiomyocytes. *Cells Tissues Organs*, 2013, 349-56 p. DOI: 10.1159/000358755
21. Pankov, R. ir Yamada, K. M. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*. 2002, 3861-3 p. DOI: 10.1242/jcs.00059
22. Bellis, S. L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 2011, 4205-10 p. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.029
23. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1996, 697-715 p. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
24. Goswami, S. Importance of integrin receptors in the field of pharmaceutical & medical science. *Advances in Biological Chemistry*, 2013, 224-52 p. DOI: 10.4236/abc.2013.32028
25. Pierschbacher, M. D. ir Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 1984, 30-3 p. DOI: 10.1038/309030a0
26. LaNasa, S. M. ir Bryant, S. J. Influence of ECM proteins and their analogs on cells cultured on 2-D hydrogels for cardiac muscle tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2009, 2929-38 p. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.05.011
27. Nivison-Smith, L. ir Weiss, A. Elastin based constructs. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. 2011, 323-40 p. DOI: 10.5772/23660
28. Mithieux, S. M. et al. Elastin. *Advances in Protein Chemistry*, 2005, 437-61 p. DOI: 10.1016/S0065-3233(05)70013-9
29. Hashimoto, T. et al. Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials*, 2004, 1407-14 p. PMID: 14643615
30. Engler, C. et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *Public Library of Science One*, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0005553

31. Weber, E. et al. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *Public Library of Science One*, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0016765
32. Newell, C. A. Plant transformation technology. *Molecular Biotechnology*, 2000, 53-65 p. DOI: 10.1385/MB:16:1:53
33. Nishizawa, K. et al. A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean. *Plant Cell Reports*, 2006, 1355-61 p. DOI: 10.1007/s00299-006-0210-x
34. Wu, H. et al. Agrobacterium-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 161-77 p. ISSN: 1573-5044
35. Komari, T. Ishida, Y. ir Hiei, Y. *Plant transformation technology: Agrobacterium-mediated transformation: Handbook of plant biotechnology: Volume I*. John Wiley & Sons Ltd., 2004, 233-61 p. DOI: 10.1002/0470869143.kc014
36. Michielse, C. B. et al. Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols*, 2008, 1671-8 p. DOI: 10.1038/nprot.2008.154
37. Hwang, H-H., Yu, M. ir Lai, E-M. *Arabidopsis Book: Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications*. The American Society of Plant Biologists, 2017. DOI: 10.1199/tab.0186
38. Barta, A. et al. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, 1986, 347-57 p. DOI: 10.1007/BF00034942
39. Sack, M. et al. From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 1094-105 p. DOI: 10.1111/pbi.12438
40. Vanden, B. R. et al. Transient expression assays in tobacco protoplasts. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 227-39 p. DOI: 10.1007/978-1-62703-414-2_18
41. Mathur, J. ir Koncz, C. *Arabidopsis Protocols: PEG-Mediated Protoplast Transformation with Naked DNA*. 1998, 267-76 p. DOI: 10.1385/0-89603-391-0:267
42. Wullems, G. J. et al. Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after in vitro *Agrobacterium tumefaciens*-induced transformation of cell wall regenerating protoplasts derived from *Nicotiana tabacum*. *Cell Biology*, 1981, 4344-8 p. DOI: 10.1073/pnas.78.7.4344
43. Niedz, R. P., McKendree, W. L., Shatters Jr., R. C. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and regeneration of transformed plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 2003, 586-94 p. DOI: 10.1079/IVP2003463

44. Gallois, P. ir Marinho, P. Leaf Disk Transformation Using *Agrobacterium tumefaciens*-Expression of Heterologous Genes in Tobacco. *Plant Gene Transfer and Expression Protocols*, 1995, 39-48 p. DOI: 10.1385/0-89603-321-X:39
45. Horsch, R. B. et al. Leaf disc transformation. *Plant Molecular Biology Manual*, 1989, 63-71 p. DOI: 10.1007/978-94-009-0951-9_5
46. Pahti, K. M., Tula, S. ir Tuteja, N. High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tobacco. *Plant Signaling and Behaviour*, 2013. DOI: 10.4161/psb.24354
47. Menges, M. ir Murray, J. A. Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2004, 635-44 p. PMID: 14756764
48. Moscatiello, R., Baldan, B. ir Navazio, L. Plant cell suspension cultures. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 77-93 p. DOI: 10.1007/978-1-62703-152-3_5
49. Forreiter, C., Kirschner, M. ir Nover, L. Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *The Plant Cell*, 1997, 2171-81 p. DOI: 10.1105/tpc.9.12.2171
50. Santos, R. B. et al. Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00297
51. Piqueras, A., Albuquerque, N. ir Folta, K. M. Transgenic crop plants: *Explants used for the generation of transgenic plants*. Berlin: Springer-Verlag, 2010, 31-47 p. DOI: 10.1007/978-3-642-04809-8_2
52. Sun, S. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2015, 861-8 p. DOI: 10.1080/13102818.2015.1056753
53. Liu, X. X. et al. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation and high efficiency of root formation from hypocotyl meristem of spring *Brassica napus* 'Precocity' cultivar. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 16840-55 p. DOI: 10.4238/2015.December.14.11
54. Guda, C., Lee, S-B. ir Daniell, H. Stable expression of biodegradable protein based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 2000, 257-62 p. ISSN: 1432-203X
55. Wang, Y-P. et al. Stable Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Chloroplasts of Tobacco. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. DOI: 10.3390/ijms17010019
56. Staub, J. M. et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology*, 2000, 333-8 p. DOI: 10.1038/73796
57. Garabagi, F., McLean, M. D. ir Hall, J. C. Transient and Stable Expression of Antibodies in *Nicotiana* Species. *Antibody Engineering*, 2012, 389-408 p. DOI: 10.1007/978-1-61779-974-7_23

58. Marquet-Blouin, E. et al. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Molecular Biology*, 2003, 459-69 p. PMID: 12650613
59. Murashige, T. ir Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 473-97 p. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
60. Menczel, L. et al. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, 191-5 p. DOI: 10.1007/BF00264975
61. Glimelius, K., Djupsjobacka, M. ir Fellner-Feldegg, H. Selection and enrichment of plant protoplast heterokaryons of Brassicaceae by flow sorting. *Plant Science*, 1986, 133-41 p. DOI: 10.1016/0168-9452(86)90049-X
62. Vieira, J. ir Messing, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 1982, 259-68 p. PMID: 6295879
63. Banerjee, S. et al. A novel prokaryotic vector for identification and selection of recombinants: Direct use of the vector for expression studies in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 2010. DOI: 10.1186/1475-2859-9-30
64. Koncz, C. ir Schell, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*, 1986, 383-96 p. ISSN: 1432-1874
65. Bergkessel, M. ir Guthrie, C. Laboratory methods in enzymology: DNA: *Colony PCR*. Elsevier, 2013, 299-309 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2
66. Ayala, D., de Lourdes Torres, M. ir Arahana, V. *Nicotiana glauca* plant regeneration protocol from mesophyll protoplasts. *Journal of Crop Improvement*, 2011, 1-10 p. DOI: 10.1080/15427528.2011.518303
67. Gill, R., Rashid, A. ir Maheshwari, S. C. Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Protoplasma*, 1978, 375-9 p. ISSN: 1615-6102
68. Grosset, J. et al. mRNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound-inducible. *Plant Molecular Biology*, 1990, 485-96 p. PMID: 2103466
69. Jung, G., Hellman, A. ir Wernicke, W. Changes in the density of microtubular networks in mesophyll cells and mesophyll derived protoplasts of *Nicotiana* and *Triticum* during leaf development. *Planta*, 1993, 10-6 p. ISSN: 1432-2048
70. Vreugdenhil, D., Harkes, P. A. A. ir Libbenga, K. R. Auxin-binding by Particulate Fractions from Tobacco Leaf Protoplasts. *Planta*, 1980, 9-12 p. ISSN: 1432-2048
71. Sankara Rao, K. ir Prakash, A. H. A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Bioscience*, 1995, 645-55 p. ISSN: 0973-7138

72. Durand, J. High and reproducible plating efficiencies of protoplasts isolated from in vitro grown haploid *Nicotiana sylvestris*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 1979, 283-95 p. DOI: 10.1016/S0044-328X(79)80262-7
73. Gill, R., Rashid, A. ir Maheshwari, S. C. Isolation of mesophyll protoplasts of *Nicotiana rustica* and their regeneration into plants flowering in vitro. *Physiologia Plantarum*, 1979, 7-10 p. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1979.tb06502.x
74. Nagata, T. ir Ishii, S. A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts. *Canadian Journal of Botany*, 1979, 1820-3 p. DOI: 10.1139/b79-226
75. Dirks, R., Sidorov, V. ir Tulmans, C. A new protoplast culture system in *Daucus carota* L. and its applications for mutant selection and transformation. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 809-15 p. DOI: 10.1007/BF00224080
76. Wallin, A. ir Eriksson, T. Protoplast cultures from cell suspensions of *Daucus carota*. *Physiologia Plantarum*, 1973, 33-9 p. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1973.tb01147.x
77. Bhojwani, S. S., Power, J. B. ir Cocking, E. C. Isolation, culture and division of cotton callus protoplasts. *Plant Science Letters*, 1977, 85-9 p. DOI: 10.1016/0304-4211(77)90176-6
78. McCormick, S. et al. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 1986, 81-4 p. ISSN: 1432-203X
79. Sunilkumar, G., Vijayachandra, K. ir Veluthambi, K. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing vir gene induction. *Plant Science*, 1999, 51-8 p. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00228-3
80. Yang, L. et al. An efficient multiplex PCR assay for early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic plant materials. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2013, 157-62 p. ISSN: 1300-011X
81. Thomas, J. C. et al. Carrot (*Daucus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 1989, 354-57 p. DOI: 10.1007/BF00716672
82. Wilken, L. R. ir Nikolov, Z. L. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 2012, 419-33 p. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.020
83. Gamborg, O. L., Miller, R. A. ir Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 1968, 151-8 p. PMID: 5650857