Bireporter vector for analysis of cis-regulatory elements in plants

Tyurin A.A., Kabardaeva K.V., Suhorukova A.V., Kouchoro F., Fridman V.A., Goldenkova-Pavlova I.V.
Institute of Plant Physiology K.A. Timiryazev Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
E-mail: alexjofar@gmail.com

Key message. A bireporter vector for the study of translational cis-regulatory elements has been created and tested.

Keywords: translational enhancers, agroinfiltration, transient expression, *N. benthamiana*

Agroinfiltration of plants has long been one of the main approaches to testing genes and regulatory elements.

The purpose of this study is to create a bireporter vector containing a tandem bundle of the internal control system and the main expression cassette.

To construct the base plasmid was used CPEC (circular polymerase extension cloning). Agroinfiltration of four-week-old *N. benthamiana* plants was carried out using *A. tumefaciens* (GV3101). The expression levels of the target genes were evaluated by fluorescence of their products. Statistical data processing and visualization was performed using the SciPy and Matplotlib libraries for Python.

The pIRF bioreport vector is designed to test translational cis-regulatory elements. The basis for the tandem vector was previously developed by the authors, the plasmid pVIG-T, optimized for transient expression in plants. The internal control system is represented by the *gfp* gene under the control of the actin promoter of *Arabidopsis*, the target expression cassette includes the *rfp* gene and the SmAM430 promoter.

To test the created vector, well-known translational enhancers are integrated into the base plasmid: plant (AT30, AT65, AT100 and AT208) and viral (Ω) origin.

The main idea in the development of PIRF is that the physical coupling of the two reporter systems will give a linear relationship during their translation. Therefore, linear regression was used to analyze fluorimetric data. Thus, the expression levels of the studied constructs were expressed by the slope of the regression line relative to the control variant.

The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 18-14-00026; IVG-P.

Бирепортерный вектор для анализа цис-регуляторных элементов в растениях

Тюрин А.А., Кабардаева К.В., Сухорукова А.В., Кучоро Ф., Фридман В.А., Голденкова-Павлова И.В.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Аннотация. Создан и апробирован бирепортерный вектор для изучения трансляционных цис-регуляторных элементов.

Ключевые слова: трансляционные энхансеры, агроинфильтрация, транзистентная экспрессия, *N. benthamiana*

Агроинфильтрация растений уже давно стала одним из основных подходов к тестированию генов и регуляторных элементов.

Цель данного исследования – создание бирепортерного вектора, содержащего тандемную связку системы внутреннего контроля и основной экспрессионной кассеты.

Для конструирования базовой плазмиды применяли CPEC (circular polymerase extension cloning). Агроинфильтрацию 4-х недельных растений *N. benthamiana* проводили, используя *A. tumefaciens* (GV3101). Уровни экспрессии целевых генов оценивали по флуоресценции их продуктов. Статистическую обработку данных и их визуализацию проводили, задействуя библиотеки SciPy и Matplotlib для Python.

Бирепортерный вектор pIRF разработан для тестирования трансляционных цис-регуляторных элементов. Основой для тандемного вектора послужила, ранее разработанная авторами, плазида pVIG-T, оптимизированная для транзистентной экспрессии в растениях. Система внутреннего контроля представлена геном *gfp* под контролем промотора актина арабидопсиса, целевая экспрессионная кассета включает ген *rfp* и промотор SmAM430.

Для тестирования созданного вектора в базовую плазмиду интегрированы известные трансляционные энхансеры: растительного (AT30, AT65, AT100 и AT208) и вирусного (Ω) происхождения.

Главная идея при разработке pIRF заключается в том, что физическое сцепление двух репортерных систем даст линейную зависимость при их трансляции. Поэтому для анализа данных флуориметрии применяли линейную регрессию. Таким образом, уровни экспрессии исследуемых конструкций выражались наклоном регрессионной прямой относительно контрольного варианта.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-14-00026; IVG-P.