

Наши исследования показали, что предположительная аминокислотная последовательность полисахрид-специфичных пероксидаз разных видов растений зачастую имеет высокую степень гомологии, что может быть обусловлено их эволюционным происхождением.

Работа выполнена при финансовой поддержке международного проекта РФФИ (№08-04-90259-Узб-а).

1. F. Passardi, C. Penel, C. Dunand. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall // *Plant Science*. – 2004. – V. 9. – P. 534–540.
2. G. Liu, X. Sheng, D. Greenshields, A. Ogieglo. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns // *Molecular Plant-Microbe Interaction*. – 2005. – V. 18. – P. 730–741.
3. N. Bacalovic, F. Passard, V. Ioannidis, C. Cosio, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand. PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. // *Phytochemistry*. – 2006. – V. 67. – P. 534–539.
4. M.L. Lagrimini, R.J. Joly, J.R. Dunlap, T.T. Liu. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development // *Plant Molecular Biology*. – 1997. – V.33. – P. 887–895.
5. K. Yoshida, P. Kaothich, T. Matsui, A. Kawaoka, A. Shinmyo. Molecular biology and application of plant peroxidase genes // *Apply Microbiology Biotechnology*. – 2003. – V. 60. – P. 665–670.
6. И.В. Максимов, Е.А. Черепанова, Л.Г. Яруллина, И.Э. Ахметова. Выделение «хитин-специфичных» оксидоредуктаз пшеницы // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2005. – Т. 41, №6. – С.616–620.

ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ СИНТЕЗА КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ДНК *Solanum melongena* l.

Е.В. Кулик, А.Н. Евтушенко

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
alena.akhrymuk@tut.by

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) с использованием в качестве исходного материала мРНК является ключевым этапом в исследовании экспрессии генов. Полноразмерная библиотечная кДНК обеспечивает целостное представление обо всех последовательностях мРНК, экспрессируемых в организме. Использование дрожжевой двухгибридной системы и сконструированной кДНК библиотеки баклажана (*Solanum melongena* L.) позволит выявить гены, кодирующие R-белки, которые определяют резистентность к фитопатогенным грамотрицательным бактериям *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. Указанные бактерии вызывают стремительное развитие таких заболеваний картофеля (*Solanum tuberosum* L.), как «мягкая гниль» и «чёрная ножка». Это обусловлено тем, что данный представитель растений семейства пасленовых не содержит R-белки. Выявление генов, детерминирующих синтез R-белков, позволит в дальнейшем конструировать трансгенные растения, устойчивые к различным патогенам.

Одним из важных этапов на пути создания двухцепочечной кДНК является получение высококачественной мРНК. Однако выделение мРНК из растительной ткани довольно проблематично, поскольку полисахариды и полифенолы образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами и в последующем осаждаются этанолом [1, 2, 3, 4]. Следовательно, метод очистки мРНК из растительной ткани требует тщательной оптимизации. Одним из способов по выделению мРНК из растительной ткани является получение тотальной РНК с последующей очисткой мРНК методом хроматографии с применением oligo(dT)-целлюлозы. Однако, ранее применив данный способ для выделения мРНК из листьев табака (*Nicotiana tabacum* L.), было обнаружено, что после первого раунда очистки количество мРНК составляет около 50%, и в образце содержатся 18S и 25S рРНК, детектируемые после проведения электрофореза на геле с бромистым этидием (рис. 1). Выход мРНК после повторного очищения может достичь 90 %, однако при этом будут наблюдаться потери продукта. Поскольку данный способ не позволял выделить мРНК необходимого качества, был использован коммерческий набор PolyATract System 1000 Promega для выделения мРНК из

ткани животных по прилагаемой инструкции с небольшими модификациями. Принцип данного метода заключается в комплементарном взаимодействии мРНК с биотинилированной oligo(dT)-пробой, которая в дальнейшем связывается со стрептавидинассоциированными парамагнитными частицами. Принимая во внимание содержание мРНК в ткани листа до 0,5 % от общего количества РНК [5], используемое количество oligo(dT)-пробы было в 10 раз меньше, чем рекомендуемое в руководстве (50 пмоль/мкл). В этом случае происходило полное насыщение oligo(dT)-пробы, что повысило эффективность выделения мРНК. В результате проведенной работы из 800 мг листьев баклажана было получено 0,7 мкг мРНК без сопутствующих рРНК и ДНК, которые остались в элюирующем растворе (рис. 2).

Выделенная мРНК использовалась для синтеза первой цепи кДНК с помощью реакции обратной транскрипции с применением набора RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas. С целью подтверждения синтеза первой цепи кДНК была проведена ПЦР с парой праймеров для фактора элонгации – EF1 (5'AAGTTTGAGACCACTAAGTACTACTGCAC3') и EF2 (5'CAAAGGTCACAACCATACCAGGCT3'). Детектированный продукт размером около 0,5 т.п.н. указывал на образование первой цепи кДНК в результате реакции обратной транскрипции.

Синтез второй цепи кДНК осуществляли, используя ПЦР и пару праймеров – NotIC (5'-CTCTGCGGCCGCCCCCCCCCCCCCCC-3') и XhoT18 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). Поскольку последовательность праймера NotIC не комплементарна 3'-концу одноцепочечной кДНК, с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы была синтезирована олигогуанозиновая последовательность на 3'-конце первой цепи кДНК. Протестировав различные режимы амплификации, было установлено, что оптимальная температура отжига праймеров составляет 60 °С, количество циклов - 16 (рис. 3, таблица). Как показано на рисунке 3, при данных условиях реакции размер синтезированной кДНК варьирует от 0,5 до 10 т.п.н., что позволит в дальнейшем создать полноразмерную кДНК библиотеку.

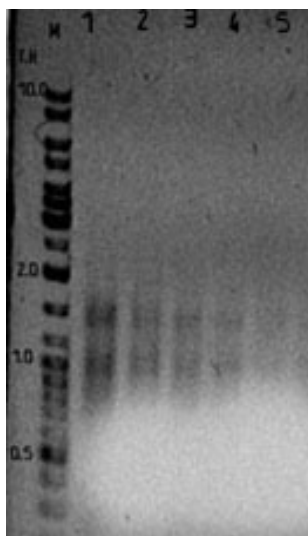


Рис. 1. Содержимое фракций (1-5) после первичной хроматографической очистки тотальной РНК листьев *Nicotiana tabacum L.* на oligo(dT)-целлюлозе. М – маркер.

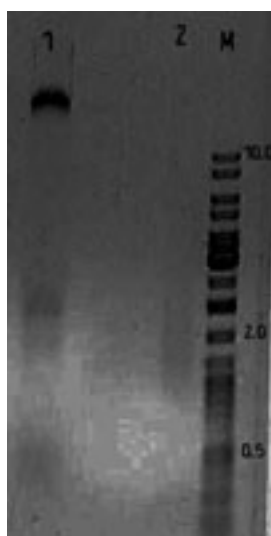


Рис. 2. Электрофоретическое детектирование компонентов фракции, не связавшихся с oligo(dT)-пробой (1), и фракции мРНК (2) из ткани листа *Solanum melongena L.* М – маркер.

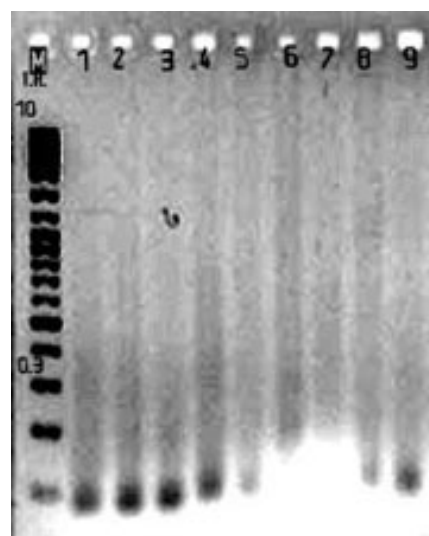


Рис. 3. Результаты синтеза двухцепочечной кДНК при различных режимах ПЦР (1-9), указанных в таблице 1. М – маркер.

Режимы ПЦР для синтеза второй цепи кДНК

Варианты режима ПЦР								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин
94°C, 30 с 50°C, 30 с 72°C, 3мин.	94°C, 30 с 55°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 60°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 50°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 55°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 60°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 50°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 55°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 60°C, 30 с 72°C, 3мин
10 циклов	10 циклов	10 циклов	16 циклов	16 циклов	16 циклов	25 циклов	25 циклов	25 циклов
72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин
4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

В результате проведенной работы была выделена высококачественная мРНК из листьев *Solanum melongena L.* с использованием набора PolyA Tract System 1000 Promega. Также показано, что, подобрав оптимальные условия полимеразной цепной реакции, можно синтезировать двухцепочечную кДНК размером до 10 т.п.н., что в последующем позволит создать кДНК библиотеку, которая будет иметь важное значение для изучения экспрессии генов.

1. A. Schneiderbauer, H.J. Sandermann. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds // *Anal. Biochem.* - 1992. - V.197. - P.91-95.
2. C. Tesniere, M. E. Vayda. Method for the isolation of high-quality RNA from grape // *Plant Mol. Biol. Repr.* - 1991. - V. 9. - P. 242-251.
3. S.-H. Cheng, B. D. Moore, J. R. Seemann. Purification of uncontaminated, intact plant RNA // *The Nucleic Acid Protocols Handbook.* - 2000. - P. 17-22.
4. M. Malnoy, J.P. Reynoirdi, F. Mourgues, E. Chevreau, P. Simoneau. A method for isolating total RNA from pear leaves // *Plant Molecular Biology Reporter.* - 2001. - № 19. - P. 69-69.
5. I. Murillo, D. Raventos, E. Jaeck, B. San Segundo. Isolation of total RNA and mRNA from plant tissues // *Promega Notes Magazine.* - 1995. - № 54. - P. 2-6.

НАСЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО

М.П. Куницкая, В.С. Анохина

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Kunitskaja_mp@bsu.by

Одной из актуальных задач является изучение частной генетики растений. В качестве объекта исследований нами был выбран люпин узколистный, имеющий значительный полиморфизм по качественным признакам и широко возделывающийся как сидеральная и кормовая культура. Несмотря на частое использование морфологических мутантов люпина узколистного в селекции, изучению наследования качественных признаков посвящено ограниченное число работ [1-3], причем имеющиеся данные по генетике люпина узколистного отрывочны и иногда противоречивы. В связи с этим целью нашей работы было изучение совместного наследования признаков окраски вегетативных органов, цветков, семян, алкалоидности и архитектоники растений. Эти признаки имеют важное таксономическое значение и могут быть маркерами селекционно ценных форм.

Генетический анализ люпина узколистного по анализируемым признакам проводили с использованием 19 образцов из России – Северный 3, Немчиновский 846, Ладный, Беларуси – Беньяконский 335, Первоцвет 1, ГЛ-174-86, Вада 18, Ланедекс 1, Лаф-рбс/2, Мужин белый, Польши – Мут 1, Migella, Швеции – Вогге, Германии – Гюльцовский, Греции – Apendrilon, США – Frost, Австралии – Unicrop, являющихся представителями разных групп в