

РАЗРАБОТКА МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

И.Н. Бердичевец¹, М.А. Гордукова¹, Я.Р. Синдаровская², Х.Р. Шимшилашвили¹,
И.В. Голденкова-Павлова¹

¹ - Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН), Москва, Россия

² - Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина
i_berdichevets@hotmail.ru, sindarovskaya@ukr.net

Полимеразная цепная реакция является удобным методом для анализа трансгенных растений. Однако, несмотря на простоту и экономичность данного метода, эффективный отбор из большого числа первичных трансформантов растений, занимает достаточно большое время. Это связано с тем, что исследователи в большинстве случаев используют следующий подход: проводят несколько поочередных ПЦР с праймерами, подобранными к исследуемым генам, при этом условия амплификации для каждой анализируемой последовательности подбираются экспериментально и зачастую отличаются друг от друга. В связи с этим оптимизация ПЦР для анализа трансгенных растений является актуальной задачей.

Для решения вышеуказанных проблемы нами для анализа трансгенных растений разработан метод мультиплексной ПЦР, который позволяет определять последовательности нескольких генов в геномной ДНК растений за один цикл амплификации.

Известно, что отбор первичных трансформантов, в большинстве случаев, основан на толерантности трансформированных клеток и тканей к селективным агентам, за счет экспрессии в них селективных генов, таких как, например, ген *nptII*. Следует, однако, отметить, что для некоторых видов растений селекционное давление негативно сказывается на их регенерационной способности, поэтому зачастую приходится либо использовать небольшую концентрацию селективного агента, либо вообще на ранних этапах не использовать селективный агент [1]. Это может приводить к отбору ложных трансформантов, способных расти на селективных средах. ПЦР с праймерами, комплементарными последовательностям селективных генов, в частности к гену *nptII*, позволяет провести анализ трансформантов-растений уже на начальных этапах их появления. Помимо этого, известно, что в результате переноса Т-ДНК при агробактериальной трансформации может проходить интеграция не полной последовательности Т-ДНК. В связи с чем, весьма важно оценивать не только наличие гена селективного маркера, но и последовательности целевого гена.

Известно, что качество образца геномной ДНК может влиять на результат ПЦР. Для этого рекомендуется проведение дополнительной ПЦР с праймерами, комплементарными одному из генов домашнего хозяйства (дополнительный внутренний контроль).

Одним из наиболее часто используемых методов трансформации растений является перенос генов с помощью агробактерий. Известно, что агробактерии способны сохраняться в сосудистой системе растений в течение нескольких поколений. Присутствие агробактерий в растительных образцах может привести к ложноположительным результатам – могут быть отобраны ложные трансформанты растений. Для того, чтобы избежать такой проблемы, необходимо доказать, что амплификация последовательностей целевых генов и гена селективного маркера проходит с геномной ДНК, а не с экспрессионного вектора, которым трансформировали штамм агробактерий. С этой целью проводят амплификацию образцов геномной ДНК растений с использованием праймеров, подобранных либо к хромосомным генам агробактерий, либо к генам, присутствующим в векторной конструкции вне области Т-ДНК.

Для разработки метода мультиплексной ПЦР нами были выбраны следующие гены: селективный ген *nptII*, обеспечивающий устойчивость к антибиотику канамицину, ген

домашнего хозяйства табака *NtGA*, кодирующий α -субъединицу GTP-связывающего белка [2], *virE* ген агробактерии штамма AGLO и репортерный ген *licB*, кодирующий термостабильную β -1,3-1,4-глюканазу (лихеназу) *Clostridium thermocellum* [3]. В данном случае репортерный ген *licB* рассматривался в качестве целевого гена.

Праймеры к последовательностям исследуемых генов были подобраны таким образом, чтобы их температуры отжига были достаточно близки, а амплифицированные фрагменты генов можно было эффективно разделять в агарозном геле.

Проведение ПЦР в достаточно широком диапазоне температур отжига праймеров к выбранным генам позволило нам подобрать одинаковые условия амплификации для каждого исследуемого гена, при которых происходит амплификация только целевой последовательности.

Далее, подобранные условия проведения ПЦР были апробированы с использованием разной комбинации двух пар праймеров к исследуемым генам, (рис. 1а). Как видно из полученных результатов, в образцах геномной ДНК только одной линии трансгенных растений (линия Т1) выявлены последовательности как гена селективного маркера, так и целевого гена. Отметим, что в образце геномной ДНК контрольного растения амплификаты последовательностей селективного и целевого гена не выявлены. Для того, чтобы показать, что отсутствие последовательности целевого гена в образце геномной ДНК первичного трансформанта линии Т2 не является результатом плохого качества препарата геномной ДНК была проведена мультиклесная ПЦР с использованием трех пар праймеров, в том числе и с праймером к гену домашнего хозяйства (рис. 1в). Как видно из представленных на рис. 1в данных, амплификация последовательности гена домашнего хозяйства и гена селективного маркера проходит успешно, однако амплификат целевого гена отсутствует. При этом, с геномной ДНК первичного трансформанта Т1 амплифицируются последовательности всех исследуемых генов.

В дальнейшей работе, были подобраны условия для проведения мультиплексной ПЦР с праймерами для всех исследуемых генов.

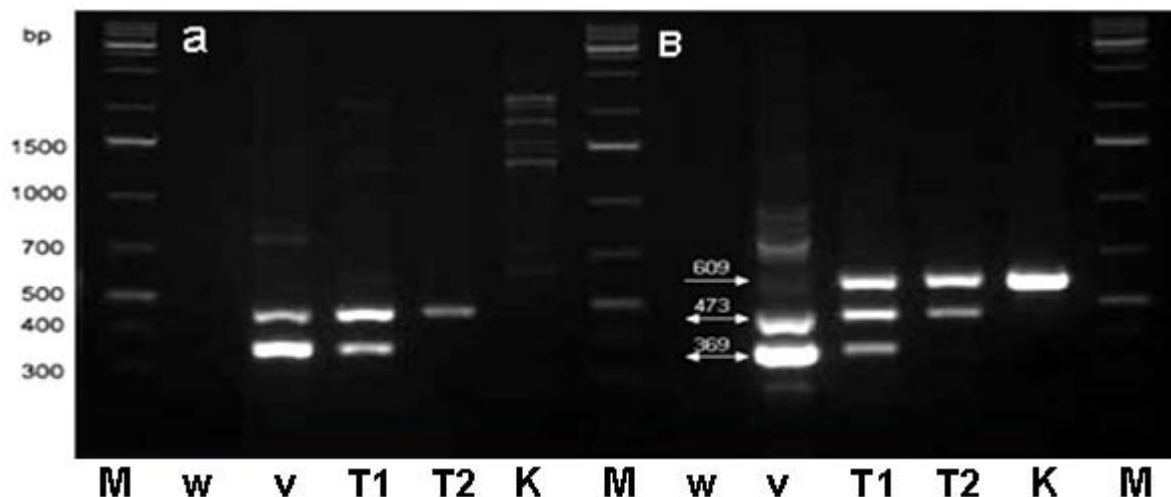


Рис. 1. Результаты амплификации геномной ДНК растений табака с праймерами к генам: а) *nptII* (473 п.н.) и *licB* (369 п.н.); в) генам *NtGA* (609 п.н), *nptII* (473 п.н.) и *licB* (369 п.н.). М – маркер молекулярного веса, w – отрицательный контроль (вместо проб ДНК использован буфер), v – экспрессионный вектор, Т1, Т2 – две независимые линии первичных трансформантов, К – контрольное растение. Слева указаны размеры фрагментов в п.н.

Таким образом, разработанный нами подход позволяет за одним раунд ПЦР проводить скрининг первичных трансформантов и выявлять наличие последовательности целевого гена, селективного гена (*nptII*), а также оценивать качество препарата, выделенной геномной

ДНК (по амплификации гена домашнего хозяйства), и отсутствие контаминации агробактериями первичных трансформантов растений.

1. T. Orlikowska. Regeneration of adventitious shoots in process of genetic transformation // In: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds). Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century. - 1999 - Kluwer, Dordrecht. - P. 185–188.
2. S. Takumi, M. Ida, Y. Haisa et al. Genomic structure and homeologous relationship of the two α -subunit genes of a heterotrimeric GTP-binding protein in tobacco // Genome. – 2002. - V.45. – P. 626–633.
3. Piruzian E.S., Goldenkova I.V., Mysiychuk K.A., Kobets N.S., Arman I.P., Bobrysheva I.V., Chekhuta I.F., Glazkova D. A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum*. Mol. Genet. Genomics. – 2002. – vol. 266, - p. 778-786.

АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПРИЗНАКОВ СЕМЕННОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У СОРТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

Т.М. Богдан, Л.М. Полонецкая, В.З. Богдан

*РУП «Институт льна», д. Устье Оришанского района, Беларусь
bogdan_V@tut.by*

Одной из объективных оценок генотипического потенциала сельскохозяйственных культур является анализ фенотипической и генотипической изменчивости количественных признаков. Информация о величине изменчивости, как основе прогноза улучшения важнейших хозяйственно ценных признаков, позволяет решать ряд вопросов практической селекции и в целом ориентировать селекционный процесс на максимальное использование генотипического потенциала [1-4].

В наших исследованиях анализ фенотипической и генотипической изменчивости признаков семенной продуктивности у сортов льна масличного проведен в двух системах диаллельных скрещиваний в течение двух поколений (F_1 - F_2).

Экспериментальный материал представлен сортами льна масличного различного эколого-географического происхождения. В первую схему диаллельных скрещиваний были включены – Небесный, Bombay sel., Linda, Trifolium, Al- 340; во вторую – Лирина, Gold Flax, Ручеек, Bison, Glenelg, Su-6-15, Небесный. Анализировали признаки: высота растения, техническая длина, длина соцветия, число коробочек, число семян/растение, масса семян/растение, масса 1000 семян. Статистическая обработка данных проведена в соответствии с 3-м методом Гриффинга [5] по программам, разработанным в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Компоненты фенотипической и генотипической вариации вычислены путем приравнивания наблюдаемых и ожидаемых средних квадратов.

Установлены высоко достоверные генотипические различия между гибридами F_1 и F_2 по всем анализируемым признакам ($P < 0,01$). Сорта льна масличного достоверно различались по ОКС, СКС и реципрокным эффектам по большинству анализируемых признаков, исключение составили средние квадраты, обусловленные СКС и реципрокными эффектами по признакам число коробочек, число семян с растения среди гибридов F_1 , F_2 первой диаллельной схемы (5 x 5) и реципрокными эффектами среди гибридов F_1 второй диаллельной схемы (7 x 7).

Сортам льна масличного характерна высокая фенотипическая изменчивость, несколько ниже показатели генотипической вариации, о чем свидетельствуют результаты анализа вариантов фенотипической (σ^2_p), генотипической изменчивости (σ^2_g) и коэффициентов наследуемости (H^2) важнейших хозяйственно ценных признаков (таблица). Высокая доля генотипической изменчивости в общей фенотипической отмечена среди генотипов льна масличного (диаллельная схема 1) по признакам высота растения, техническая длина – F_1 , F_2 ; число семян/растение, масса семян/растение, масса 1000семян - F_2 .