

Psoralea drupacea Bunge (Leguminosae). Hairy roots have been induced in leaf explants using *A.rhizogenes*-mediated genetic transformation. All these types of aseptic cultures are studied as a possible source of biologically active compounds.

БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н., ГОРДУКОВА М.А., ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р., СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.¹, ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹, ФАДЕЕВ В.С., ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: i_berdichevets@hotmail.ru;*

*¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: sindarovskaya@ukr.net*

ДИЗАЙН СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ОТБОРА И АНАЛИЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Важным этапом в процессе создания трансгенных растений является эффективный отбор первичных трансформантов, содержащих в геноме вставку целевого гена, а также последующий анализ наследования трансгена в ряду поколений. Простым и экономичным методом для этого является полимеразная цепная реакция. Однако для того, чтобы проанализировать трансформанты необходимо решить ряд задач и провести несколько полимеразных цепных реакций, условия для каждой из которых необходимо подбирать индивидуально, что в конечном итоге занимает достаточно много времени. В связи с этим оптимизация условий ПЦР для эффективного отбора и анализа трансгенных растений является актуальной задачей.

Известно, что встройка трансгена в геном растения-реципиента довольно редкое событие. Поэтому для трансформации используются вектора с маркерными генами, экспрессия которых обеспечивает толерантность трансформантов к селективному давлению. Присутствие селективного агента в среде культивирования повышает эффективность отбора предположительных трансформантов и значительно сокращает объем работы. Наибольшее распространение получили маркерные гены, обеспечивающие устойчивость к таким селективным агентам как антибиотики или гербициды, например *nptII* ген, обеспечивающий резистентность к антибиотику канамицину, или ген *bar*, обеспечивающий устойчивость к фосфинотрицину – действующему началу гербицида с коммерческим названием «Баста». Однако, следует отметить, что для ряда видов растений селекционное давление негативно сказывается на процессах каллусо- и морфогенеза, поэтому зачастую приходится либо использовать меньшие концентрации 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, позволяет провести анализ растений-регенерантов и исключить ложные трансформанты из эксперимента уже на начальных стадиях их появления.

В настоящее время 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 также может привести к ложноположительным результатам – могут быть отобраны ложные трансформанты растений. Поэтому для того, чтобы доказать, что амплификация последовательностей исследуемых генов проходит с геномной ДНК, а не с

экспрессионного вектора и/или геномной ДНК агробактерий, необходимо провести амплификацию образцов с праймерами, подобранных либо к хромосомным генам агробактерий, либо к генам, присутствующим в векторной конструкции вне области Т-ДНК.

Известно, что на результат ПЦР может влиять качество препарата ДНК. Поэтому ряд авторов рекомендуют в качестве внутреннего контроля проводить амплификацию генов домашнего хозяйства (house-keeping genes) [2].

В работах по созданию трансгенных растений часто используют репортерные гены. В частности в нашей лаборатории используется технология переноса в растения гибридных генов: в экспрессионном векторе целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние с репортерным геном [3]. ПЦР с праймерами к репортерному гену позволяет провести анализ первичных трансформантов и с высокой степенью вероятности предполагать, что отобранные будут содержать и целевые гены. Поскольку известно, что в результате переноса Т-ДНК при агробактериальной трансформации может проходить интеграция не полной последовательности Т-ДНК, весьма важно оценивать не только наличие репортерного или селективного генов, но и последовательности целевого гена.

В связи со всем вышеуказанным целью наших исследований - разработка метода мультиплексной ПЦР, который позволил бы за один цикл амплификации определять в геномной ДНК растений последовательности нескольких генов.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали коллекцию первичных трансформантов табака, арабидопсиса, картофеля, томатов, салата и свеклы.

Выделение ДНК. Образцы геномной ДНК выделяли из листьев с помощью СТАВ метода.

Мультиплексная ПЦР. Праймеры для ПЦР подбирали с помощью программы VectorNTI Suite 9.

Результаты и обсуждение

Для разработки метода мультиплексной ПЦР были выбраны следующие гены: селективный ген, гены домашнего хозяйства исследуемых видов трансгенных растений из коллекции лаборатории, гены вирулентности *Agrobacterium tumefaciens* используемого штамма, репортерный ген, ряд целевых генов и регуляторных элементов. Праймеры к исследуемым последовательностям были подобраны таким образом, чтобы условия их амплификации были сходными, а амплифицированные фрагменты можно было эффективно разделять в агарозном геле (рисунок 1).

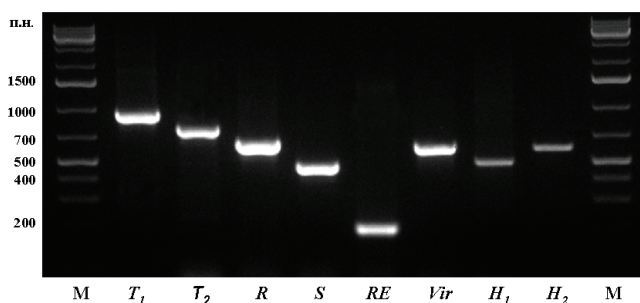


Рисунок 1. Результаты амплификации генов и регуляторных элементов, использованных для разработки метода мультиплексной ПЦР. М – маркер молекулярного веса, T₁, T₂ - целевые гены, R - репортерный ген, S - селективный ген, RE - один из используемых регуляторных элементов, VirE - ген вирулентности *Agrobacterium tumefaciens*, H₁, H₂ - гены домашнего хозяйства.

Проведение ПЦР в достаточно широком диапазоне условий амплификации с

использованием праймеров к выбранным генам позволило нам подобрать одинаковые условия реакции для каждого исследуемого гена, при которых происходит амплификация только целевой последовательности.

Первоначально подобранные условия проведения ПЦР были апробированы с использованием разной комбинации двух пар праймеров к исследуемым генам (рис 2 а). Как видно из полученных результатов в образце 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 мультиплексная ПЦР с использованием трех пар праймеров, в том числе и с праймерами к гену домашнего хозяйства (рис. 2 б). Как видно из представленных данных, в случае линии Т2 амплификация последовательности гена домашнего хозяйства и гена селективного маркера проходит успешно, однако продукт целевого гена отсутствует (рис. 2 б). При этом, с геномной ДНК первичного трансформанта Т1 амплифицируются последовательности всех исследуемых генов. Полученные результаты показывают, что уже на стадии триплексной ПЦР можно эффективно исключать из эксперимента растения, не содержащие вставку целевого гена.

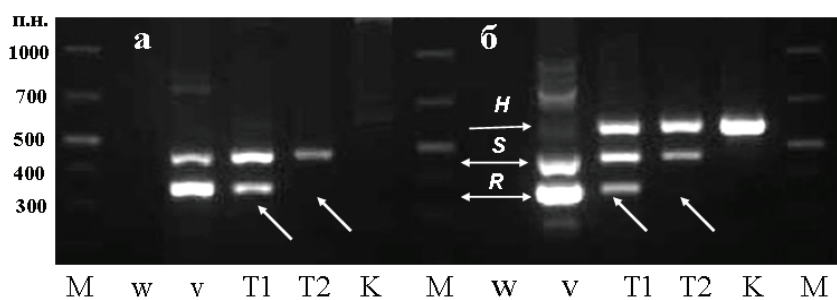


Рисунок 2. Результаты мультиплексной ПЦР геномной ДНК растений табака. Н - ген домашнего хозяйства, S - селективный ген, R - репортерный ген. М – маркер молекулярного веса, w – отрицательный контроль (вместо проб ДНК использован буфер), v – экспрессионный вектор, Т1, Т2 – две независимые линии первичных трансформантов, К – контрольное растение.

Далее, были подобраны оптимальные соотношения каждого из праймеров системы и условия мультиплексной ПЦР, при которых происходит амплификация всех целевых последовательностей с одинаковой эффективностью (рисунок 3).

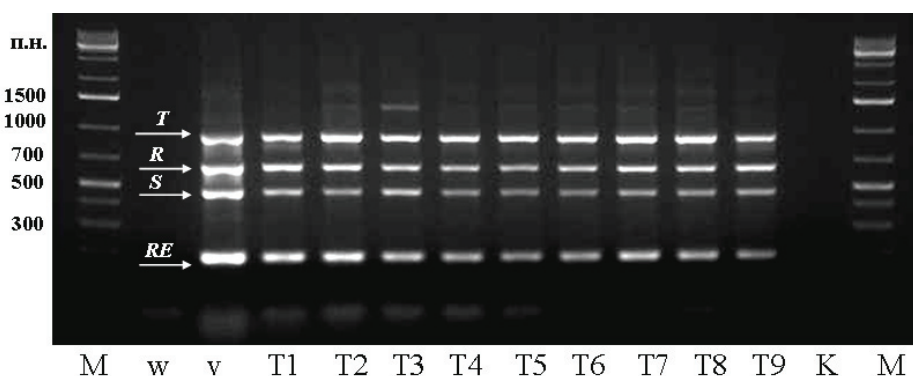


Рисунок 3. Результаты мультиплексной ПЦР геномной ДНК растений картофеля. Т - целевой ген, R - репортерный ген, S - селективный ген, RE - один из используемых регуляторных элементов. М – маркер молекулярного веса, w –

отрицательный контроль, v – экспрессионный вектор, T1-T9 – независимые линии первичных трансформантов, K – контрольное растение.

Данный подход успешно апробирован на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на коллекции трансформантов сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Выводы

Таким образом, нами разработан подход, позволяющий за одним раунд ПЦР проводить скрининг первичных трансформантов и выявлять наличие последовательностей целевых генов, селективного гена, репортерного гена, ряда регуляторных элементов, а также оценивать качество препарата, выделенной геномной ДНК, и отсутствие контаминации агробактериями первичных трансформантов растений.

Литература

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. Mannerlof M., Tenning P. Screening of transgenic plants by multiplex PCR // Plant Mol. Biol. Rep. – 1997. – vol. 15. – P. 38–45.
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.

Резюме

Разработана система праймеров, их оптимальные соотношения и условия мультиплексной ПЦР для эффективного отбора и дальнейшего анализа трансгенных растений. Система успешно апробирована на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на трансформантах сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Set of specific primers and multiplex PCR conditions have been developed for effective selection and analysis of transgenic plants. This methodology was approved on collection of model plants (transgenic tobacco and Arabidopsis) and some transgenic crops (potato, tomato, beet and lettuce).

БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРІДОНОВА К.В., КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ *UNGERNIA VICTORIS*

Унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko, *Amaryllidaceae*) – ендемічна рослина Таджикистану та Узбекистану, препарати ізохінолінових алкалоїдів та біологічно активних полісахаридів якої застосовують для лікування широкого спектру захворювань м'язової, травної та дихальної систем [1]. Активна експлуатація природних ресурсів цього рідкісного виду створює небезпеку скорочення його чисельності та зменшення генетичного різноманіття. Це зумовлює актуальність розробки шляхів прискореного розмноження та збереження генофонду виду. На сьогодні розроблено умови мікроклонального розмноження *U. victoris* як шляхом прямої регенерації із фрагментів лусок цибулин, так і шляхом індукції регенерації із