

Developmental changes of mRNA alpha -subunit ENaC and SGK1 abundance in 10 day and adult rat kidney were investigated by RT-PCR. The level of both genes expression was less in kidney cortex of 10 day rat compared with the adult one ( $p < 0.05$ ). There was no long time genomic effect of the aldosterone induction (5mg/100g) on the mRNA of the alpha-subunit ENaC abundance within 5.5 hours and aldosterone raised mRNA SGK-1 abundance in young rat renal cortex, in contrast to adult rats.

**ЛОГИНОВА Д.Б., ДЕЙНЕКО Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, проспект Лаврентьева 10, e-mail: loginova@bionet.nsc.ru*

### **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЗАИЧНОГО ХАРАКТЕРА ПРОЯВЛЕНИЯ МАРКЕРНОГО ГЕНА *nptII* У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА**

При случайном характере интеграции в растительный геном фрагментов экзогенной ДНК перенесенные гены могут попадать в различные районы ядерного генома растений. Характер их проявления в таких случаях будет определяться особенностями организации района интеграции, в связи с этим генетически модифицированные растения могут служить удобными моделями для изучения функционирования перенесенных генов.

В лаборатории биоинженерии растений созданы трансгенные растения табака с мозаичным проявлением маркерного гена *nptII*, определяющего устойчивость к антибиотику канамицину (линия Nu 21), что фенотипически проявлялось в чередовании белых и зеленых секторов на листовых пластинках растений, выращенных на селективной среде с канамицином. Маркерный ген был интегрирован в виде двух тесно сцепленных копий. Мозаичный характер сохранялся у потомков от самоопыления T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>. Отбор по стабильности проявления маркерного гена позволил выделить среди T<sub>4</sub> растений линии, характеризующиеся полной (Nu 21/5-4/1 – зеленый цвет листовых пластинок), либо частичной (Nu 21/6-4/1 - чередование зеленых и белых участков) устойчивостью к антибиотику.

Целью данной работы было изучение особенностей проявления маркерного гена *nptII* у потомков от самоопыления и у гибридов от скрещивания растений линии Nu 21, характеризующихся стабильным и мозаичным проявлением *nptII*-гена.

#### **Материалы и методы**

Исходным материалом для проведения исследований служили потомки 4 поколения (T<sub>4</sub>) от самоопыления табака линии Nu 21 из коллекции лаборатории биоинженерии растений ИЦиГ СО РАН. Растения линии Nu 21/6-4/1 характеризуются высоким процентом появления растений с мозаичным характером проявления маркерного гена *nptII*; окраска листьев - мозаичная (чередование зеленых и белых участков). Растения линии Nu 21/5-4/1 характеризуются стабильной экспрессией маркерного гена *nptII*; окраска листьев - зеленая. В качестве контроля использовались растения нетрансгенной линии SR1.

Трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамма XL10 проводили методом теплового шока [1]. Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи QIAGEN Plasmid Midi Kit (N.12145) согласно методике производителя. Выделение геномной ДНК из листьев табака проводили по стандартной методике [2] с модификациями. Гибридизацию по Саузерну проводили по стандартной методике [3] с модификациями, радиоактивно меченый зонд получали методом ПЦР.

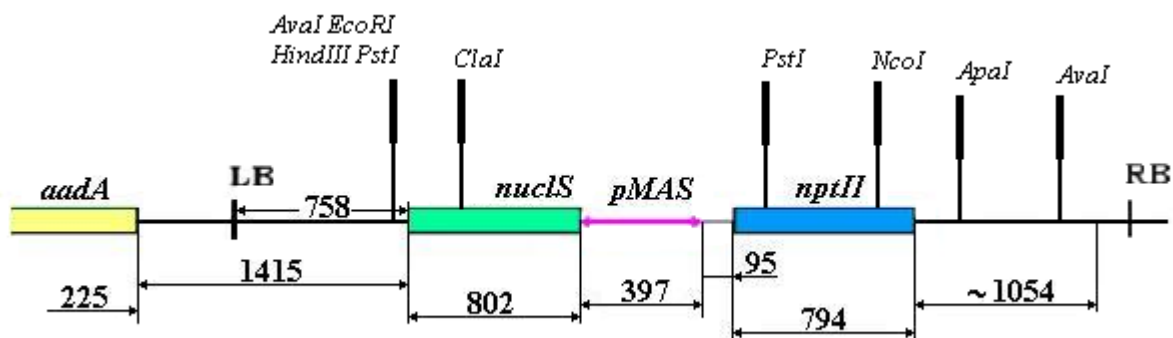
#### **Результаты и обсуждение**

Получены гибриды первого поколения от скрещивания растений линии Nu 21/6 с мозаичным проявлением маркерного гена *nptII* с растениями линии Nu 21/5 с стабильным проявлением гена *nptII*, гибриды первого поколения от скрещивания растений линии Nu 21/5 с растениями контрольной линии SR1 (нетрансгенная) и гибриды первого поколения от скрещивания растений линии Nu 21/6 с растениями контрольной линии SR1.

Анализ гибридов F1 от скрещивания растений линий Nu 21/6 и SR1 показал, что частота появления растений-мозаиков в среднем составляла 42,29% в случае, когда в качестве материнской особи брали растение Nu 21/6 и 53,75% в случае, когда в качестве материнской особи брали растение SR1. Для гибридов от скрещивания растений линий Nu 21/5 и SR1 данная частота составляла 6,81% и 16,70%, соответственно. При реципрокном скрещивании растений линий Nu 21/5 и Nu 21/6 частота появления мозаиков в среднем составляла 62,27% (Nu 21/5 - материнская особь) и 37,58% (Nu 21/6 - материнская особь). Частота появления мозаично окрашенных растений у потомков от самоопыления трансгенных растений табака линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в среднем составлял 1,9% и 58,5%, соответственно.

Таким образом, число мозаично окрашенных растений у гибридов от скрещивания растений табака линий Nu 21/5 и SR1 значительно увеличивалось по сравнению с числом потомков от самоопыления растений линии Nu 21/5. Число растений с мозаичным характером проявления маркерного гена *nptII* в гибридах от скрещивания растений табака линий Nu 21/6 и SR1 практически не отличалось от такового у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6. Частота появления мозаиков у гибридов от скрещивания растений линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в среднем была ниже, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6, и значительно выше, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/5.

Восстановление стабильной экспрессии *nptII*-гена у растений линии Nu 21/5 предположительно могло произойти в результате рекомбинации между двумя копиями Т-ДНК, так как ранее в геномных ДНК трансгенных растений 1-го и 2-го поколений (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>), полученных от самоопыления растений линии Nu 21, нами выявлено два фрагмента, предположительно соответствующих двум копиям Т-ДНК [4]. Оба фрагмента наследовались сцепленно среди потомков T<sub>1</sub> и T<sub>2</sub>. Однако данное предположение оказалось несостоятельным, так как Саузерн-блот анализом в геномой ДНК трансгенных растений линии Nu 21/5-4/1 установлено не менее 2-х фрагментов Т-ДНК.



**Рис. 1.** Схема Т-области генетической конструкции рС27-*nuclS* (растение Nu 21):

*aadA*- ген устойчивости к спектиномицину (X12870); *nuclS* - ген секреторной эндонуклеазы *Serratia marcescens*; *nptII* - ген неомизинфосфотрансферазы II *E.coli*; *pMAS*- двунаправленный промотор гена маннопинсинтазы T<sub>i</sub>-плазмиды *A.tumefaciens*; LB, RB - повторы, окаймляющие Т-область T<sub>i</sub>-плазмиды *A.tumefaciens*.

Для получения трансгенных растений линии Nu 21 использована плаزمида рС27-*nuclS*, включающая в Т-области гены эндонуклеазы рестрикции *Serratia*

*marcescens*, неомидифосфотрансферазы II *E.coli* под управлением двунаправленного промотора гена маннопинсинтазы Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, однако точная нуклеотидная последовательность генов не была определена. Для определения нуклеотидной последовательности области генов было проведено секвенирование области T-ДНК плазмиды pC27-*nuclS*. Методом BLAST по базе данных DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp>) выявлена область гомологии нуклеотидной последовательности области T-ДНК с последовательностью MAS промотора (X68599) протяженностью 392 п. н., с геном *nptII* (V00618) протяженностью 794 п.н., и геном *nuclS* (M19495) протяженностью 802 п.н. На рисунке 1 представлена схема T-области генетической конструкции pC27-*nuclS* с сайтами рестрикции. По результатам секвенирования было выявлено наличие некодирующей области длиной 95 п.н. между правой границей области *pMAS* и левой границей гена *nptII*. Также были обнаружены участки нуклеотидной последовательности, гомологичные некодирующим районам Ti плазмиды pTi15955 *A. tumefaciens* (X00493), прилегающие к левой границе гена *nuclS* и правой границе гена неомидифосфотрансферазы II *E.coli*.

На основании полученных ранее результатов о наличии двух близко расположенных встроок T-ДНК в геноме трансгенных растений линий Nu 21/5, Nu 21/6 и известной нуклеотидной последовательности T-ДНК, проведено определение положения 2-х встроок T-ДНК относительно друг друга. Для этого был проведен ПЦР анализ с использованием различной комбинации праймеров, подобранных на границы области T-ДНК. В результате мы получили фрагмент, соответствующей размеру ДНК порядка 2300 п.н., выявление такого фрагмента возможно только в случае прямой ориентации 2-х копий T-ДНК в геноме («голова к хвосту»).

Итак, по результатам ПЦР анализа установлено, что копии T-ДНК в растительном геноме располагаются одна за другой и имеют ориентацию «голова к хвосту» как для растений с канамицин-устойчивым (Nu 21/5-4/1), так и для растений с канамицин-неустойчивым фенотипом (Nu 21/6-4/1).

Известно, что наличие повторенных последовательностей в прямой и обратной ориентации может приводить к замолчанию перенесенных генов [5], следовательно, можно предположить, что наличие двух копий T-ДНК в геноме исследуемых трансгенных растений могло послужить причиной замолкания маркерного гена *nptII*.

Одним из предположительных механизмов замолкания может быть метилирование последовательности промотора перенесенных генов [6]. Определение статуса метилирования ДНК канамицин-устойчивых растений линий Nu 21/5-4/1 и Nu 21/6-4/1 проводили методом Саузерн-блот гибридизации с использованием метилчувствительной и метилнечувствительной эндонуклеаз рестрикции *MspI/HpaII*. *HpaII* расщепляет ДНК по неметилированным сайтам, *MspI* - по всем сайтам, независимо от метилирования узнаваемой последовательности. Одинаковая картина гибридизации после расщепления эндонуклеазами рестрикции *HpaII* и *MspI* свидетельствовала об отсутствии метилирования сайтов рестрикции в зеленых растениях исследуемых линий. Однако полученные данные не отвергают гипотезы о замолкании генов посредством метилирования ДНК в трансгенных растениях линии Nu 21/6-4/1. Данная гипотеза будет служить объектом исследований в дальнейшем.

### **Выводы**

Проведен анализ взаимодействия аллелей гена *nptII* в гибридах первого поколения от скрещивания трансгенных растений табака линий Nu 21/5 и Nu 21/6 между собой и с растениями нетрансгенной линии SR1. Показано увеличение числа мозаично окрашенных растений у гибридов от скрещивания растений табака линий Nu 21/5 с растениями нетрансгенной линии SR1, по сравнению с потомками от самоопыления растений линии Nu 21/5. Число растений с мозаичным характером проявления маркерного гена *nptII* в гибридах от скрещивания растений табака линий

Nu 21/6 и SR1 практически не отличалось от такового у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6. Частота появления мозаиков у гибридов от скрещивания растений линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в среднем была ниже, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/6, и значительно выше, чем у потомков от самоопыления растений линии Nu 21/5.

Методом Саузерн-блот гибридизации подтверждено наличие не менее двух встроок Т-ДНК в геном растений линии Nu 21/5-4/1.

Определена последовательность нуклеотидов области Т-ДНК плазмиды pC27-*nuclS*, подобраны праймеры для анализа района интеграции трансгена у растений линии Nu21 на основе амплификации последовательностей с неизвестной первичной структурой. По результатам анализа установлено, что последовательности двух Т-ДНК ориентированы «голова к хвосту» (в виде повторенных фрагментов в прямой ориентации), и расположены одна за другой, возможно, без включения участка растительной ДНК между ними.

Показано отсутствие метилирования последовательности *pMAS* Т-ДНК в зеленых растениях трансгенной линии Nu 21/5, и Т-ДНК зеленых листьев растений линии Nu 21/6 в районе сайта рестрикции эндонуклеаз *HpaII/MspI*.

### Литература

1. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. - М.: Мир, - 1988. – с.
2. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. - 1985. - V. 5. - P. 69-76.
3. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory Manual. - New York. - Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 1982.
4. Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Мозаичный характер проявления гена *nptII* у трансгенных растений табака Nu 21 // Генетика. - 2007. - Т. 43, №7. - С.1-11.
5. Wang M.B., Waterhouse P.M. High-efficiency of a  $\beta$ -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation // Plant Molecular Biology. - 2000. - V. 43. - P.67-82.
6. Haque A.K., Yamaoka N., Nishiguchi M. Cytosine methylation is associated with RNA silencing in silenced plants but not with systemic and transitive RNA silencing through grafting // Gen. - 2007. - V. – 396, №2. - P.321-331

### Резюме

Подтверждено наличие не менее двух инсерций Т-ДНК в геном растений линии Nu 21. Исследован характер взаимодействия аллелей гена *nptII* у гибридов 1 поколения от скрещивания трансгенных растений табака линий Nu 21/5 и Nu 21/6 между собой и с растениями нетрансгенной линии SR1. Определена последовательность нуклеотидов области Т-ДНК плазмиды pC27-*nuclS*. Показано, что копии Т-ДНК в растительном геноме имеют ориентацию «голова к хвосту» и расположены одна за другой. Показано отсутствие метилирования последовательности *pMAS* Т-ДНК в зеленых листьях растений трансгенных линий Nu 21/5 и Nu 21/6 в районе сайта рестрикции эндонуклеаз *HpaII/MspI*.

Presence of no less than two T-DNA insertions into line Nu 21 plant genome was confirmed. Interaction character between *nptII* gene alleles was analyzed in Nu 21/5, Nu 21/6 lines 1 generation crossing hybrids and in Nu 21/5, SR1 (wild-type line) and Nu 21/6, SR1 1 generation crossing hybrids. Plasmid pC27-*nuclS* T-DNA part sequence was determined. It was shown that T-DNA copies are located one after another and have orientation “head to tail”. It was also determined that T-DNA *pMAS* sequence aren't

methyated on endonucleases *HpaII/MspI* restriction sites in green leaf of Nu 21/5 and Nu 21/6 line transgenic plants.

**МИРОСЬ Е. Л.<sup>1</sup>, КОЗЕРЕЦКАЯ И. А.<sup>2</sup>, АНДРИЕВСКИЙ А. М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: [www.mel1982@mail.ru](mailto:www.mel1982@mail.ru)

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Т. Г. Шевченко,  
Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64

## **ПОЛИМОРФИЗМ И ЭКСПРЕССИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У САМЦОВ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ**

В природных условиях живые организмы подвергаются комплексному влиянию факторов окружающей среды физической и химической природы, которые в сочетании с радиацией могут приводить к новым неожиданным биологическим эффектам. [1].

Как отмечается в ряде работ [2, 3], многие протеолитические и эстеразные ферменты, выполняя в организме важную роль поддержания физиологического баланса свободных и связанных органических кислот, могут демонстрировать адаптационные возможности организма [4]. К сожалению, показатели фенотипического фенотипа у отдельных видов организмов, обитающих в экстремальных условиях, практически не изучены. В связи с этим, данная экспериментальная работа проводилась с целью исследовать полиморфизм и экспрессию основных ферментов карбоксиэстеразной системы у дрозофил взятых из регионов, характеризующихся разным уровнем радиации в зоне отчуждения [5]. В задачи данного исследования входило изучить экспрессию карбоксиэстераз у самцов *Drosophila melanogaster* Чернобыльской зоны отчуждения.

### **Материалы и методы**

Материалом исследований служили линии дикого типа *Drosophila melanogaster*, которые были отобраны из природных популяций Чернобыльской зоны отчуждения: *Чернобыльская 1* (г. Чернобыль; уровень радиации 50 мкР/ч), *Чернобыльская 2* (г. Полеское; уровень радиации 50 мкР/ч), *Чернобыльская 3* (водоём-охладитель ЧАЭС; уровень радиации 2 100мкР/ч). В качестве объекта сравнения использовали лабораторную линию дикого типа *Одесская 1* (г. Одесса; уровень радиации соответствует норме).

Линии разводили и поддерживали при одинаковых условиях: в темноте при постоянной температуре 25 °С на стандартной питательной среде [6].

Для определения ферментативной экспрессии карбоксиэстераз [7] готовили экстракты тканей отдельно взятых самцов имаго (предварительно наркотизированных диэтиловым эфиром) в 10 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 9,0 с 1 % тритона X-100. Гомогенаты тканей центрифугировали на холоде при 10 000 g в течение 15 мин, после чего надосадочные жидкости отбирали и смешивали с 5 мкл 0,01 % раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60 % растворе сахарозы. Полученные ферментсодержащие экстракты подвергали щелочному электрофорезу в 10 % полиакриламидном геле. После электрофоретического разделения гелевые блоки с локализованными в них ферментами отмывали в дистиллированной воде и выдерживали 10 мин в нейтральном буфере. Далее гелевые пластины инкубировали 20 мин при 25 °С в 25 мл 0,1 М трис-глицинового буфера pH 7,4, содержащего по 12 мг  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтилацетатов и 25 мг соли диазония — прочного синего. Реакцию ферментативного расщепления субстратов