

АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ: ПАРА УНИВЕРСАЛЬНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 35S ПРОМОТОРА

Разработаны праймеры для амплификации фрагмента последовательности 35S промотора вируса мозаики цветной капусты с помощью полимеразной цепной реакции. Это позволяет проводить анализ трансгенных растений, трансформированных любой конструкцией, содержащей 35S промотор. Показана возможность скрининга трансгенных растений ряда видов, включая *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum*, *Triticum vulgare*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*.

Введение. Амплификация определенных последовательностей ДНК *in vitro* при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) является мощным и высокочувствительным методом, нашедшим широкое применение во многих областях молекулярной биологии [1]. Особенно удобен этот метод для быстрого анализа предполагаемых трансгенных организмов, где задача сводится к поиску в большом геноме последовательности ДНК, вводимой в процессе трансформации. Для амплификации участка, интересующего исследователя, в каждом конкретном случае требуется пара затравок, последовательности которых определяются таковыми амплифицируемого фрагмента. Ранее уже были разработаны праймеры для амплификации части последовательностей маркерных и репортерных генов, применяемых для селекции трансгенных растений: неомицинфосфотрансферазы, глюкуронидазы, нопалинсинтазы [2]. Так как в большинстве химерных генов, вводимых в растения, используется 35S промотор вируса мозаики цветной капусты [3, 4], цель настоящей работы состояла в подборе пары удобных праймеров для амплификации последовательности этого промотора. В таком случае становится возможным анализ трансформантов, полученных после трансформации любым геном, находящимся под контролем 35S промотора.

Материалы и методы. В работе использовали ДНК-амплификатор ААГ-66, *Taq*-полимеразу, стоки дезоксинуклеозидтрифосфатов, олигонуклеотидные затравки производства НПО «Прогресс» (Украина).

Растительным материалом для анализа служили трансгенные растения *N. tabacum*, *P. sativum*, *T. vulgare*, *B. oleracea*, *B. napus*, полученные после трансформации различными химерными генами, содержащими 35S промотор. Трансгенные растения любезно предоставлены Т. Пастернаком, Л. Рачек, А. Гиричем, Н. Кучуком (Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины, Киев).

Суммарную растительную ДНК выделяли с использованием СТАВ [5].

Реакцию амплификации проводили в объеме 35 мкл, реакционная смесь состояла из 10 мМ трис-НСl, рН 8,3, 50 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01 %-я желатина, 200 мкМ dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 ед. *Taq*-полимеразы и 10—1000 нг суммарной растительной ДНК, по 1 мкМ праймеров.

Денатурацию вели при 92 °С в течение 30 с, отжиг — при 55—67 °С в течение 15 с, полимеризацию — при 72 °С в течение 10 с.

Электрофорез продуктов амплификации осуществляли в 2 %-м агарозном геле при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30 мин в ТВЕ-буфере.

Результаты и обсуждение. В большинстве генноинженерных конструкций, предназначенных для трансформации растений, в качестве мощного промотора используется 35S промотор вируса мозаики цветной капусты [3]. Размеры последовательности промотора варьируют от 400 до 600 п. н. Однако во всех конструкциях присутствует коровая часть промотора размером около 290 п. н. Для выбора наиболее универсальной пары олигонуклеотидных затравок анализировали исключительно эту коровую часть. В результате анализа мы остановились на следующих последовательностях длиной 21 нуклеотид: 5'-TCATTG—CGATAAAGGAAAGGC-3', позиции — 372—393;

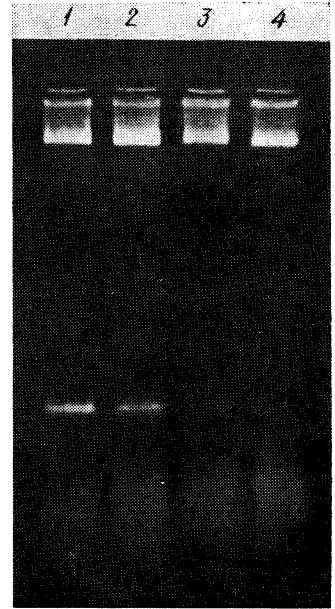
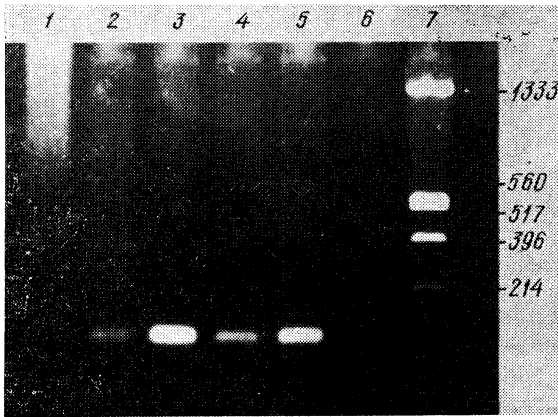


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации ДНК трансгенных линий табака, полученных после трансформации геном ДНК-топоизомеразы II типа под контролем 35S промотора: 1 — ДНК нетрансформированного растения; 2—5 — ДНК трансгенных линий табака; 6 — реакционная смесь без добавления ДНК (отрицательный контроль); 7 — маркерная ДНК (фрагменты плазмиды *pUC18*, образовавшиеся в результате расщепления рестриктазой *HinfI*)

Рис. 2. Анализ продуктов амплификации растительной ДНК трансгенного табака в зависимости от количества циклов амплификации (в реакции использовали 500 нг растительной ДНК): 1 — 35; 2 — 30; 3 — 25; 4 — 20 циклов

5'-TTGCGAAGGATAGTGGGATTG-3', позиции — 206—227 по «+»-цепи промотора. При подобном выборе затравок длина амплифицируемого продукта составляет 189 п. н.

Первоначально при проведении амплификации использовали температуру отжига 55 °С как среднюю температуру плавления олигонуклеотидов длиной 21 п. н. Однако при этой температуре возможно было наблюдать появление полос неспецифической амплификации. В связи с этим была экспериментально подобрана температура отжига, равная 67 °С, при которой полностью исчезает неспецифическая амплификация и существенно возрастает эффективность амплификации необходимого фрагмента. Данные одного из экспериментов по амплификации ДНК трансгенного табака, содержащего ген ДНК-топоизомеразы II дрозофилы под контролем 35S промотора [6], показаны на рис. 1. Результаты амплификации полностью совпадают с таковыми Саузерн-блоттинг-гибридизации. На дорожках, соответствующих ДНК трансгенных растений, четко виден амплифицированный фрагмент. В этом случае проводили 30 циклов амплификации. Далее мы попытались подобрать наиболее эффективное количество циклов для амплификации растительной ДНК. Амплификацию осуществляли в течение 20, 25, 30, 35 циклов.

В результате можно сделать вывод о том, что оптимальное количество циклов амплификации при использовании предлагаемых праймеров равно 30, так как после этого существенного увеличения количества амплифицированной ДНК не происходит и реакция достигает насыщения.

Следующей задачей явилось определение того минимального исходного количества растительной ДНК, при котором можно получать надежную и воспроизводимую амплификацию нужного фрагмента (в вышеупомянутых экспериментах использовали 100—500 нг суммарной растительной ДНК трансгенного табака). Результаты амплификации разных количеств суммарной растительной ДНК представлены на

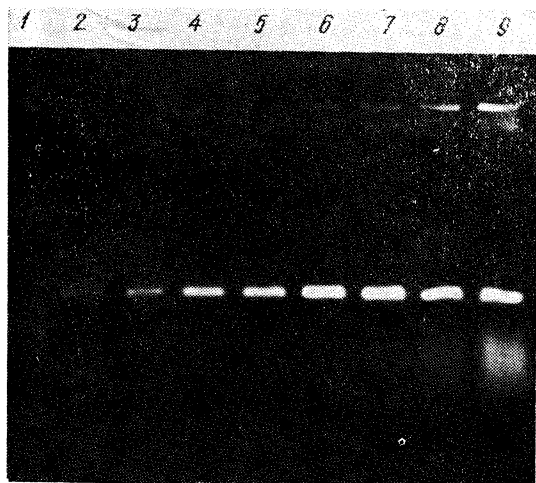


рис. 3, откуда видно, что эффективная амплификация наблюдается при использовании исходной ДНК в пределах от 10 до 1000 нг без существенного уменьшения количества амплифицированного фрагмента.

Важным моментом для амплификации является сте-

Рис. 3. Электрофорез продуктов амплификации ДНК трансгенных линий табака в зависимости от исходного количества растительной ДНК (30 циклов амплификации): 1—0; 2—10; 3—25; 4—50; 5—100; 6—200; 7—300; 8—500; 9—1000 нг

пень очистки исходной растительной ДНК. Ранее предлагались максимально упрощенные методики для амплификации последовательностей растительной геномной ДНК [7—9]. Однако подобные простые способы позволяют амплифицировать ДНК далеко не всех видов. В наших экспериментах для выделения растительной ДНК использовали методику минивыделения при помощи СТАВ [6]. Мы рекомендуем использовать именно этот подход для приготовления растительной ДНК, который будет в дальнейшем использован в ПЦР. При всей своей простоте он позволяет избавиться практически полностью от полифенольных соединений и полисахаридов, которые могут ингибировать полимеразную реакцию.

Наконец, мы проверили эффективность амплификации ДНК из различных растительных объектов. Ранее сообщалось, что при выделении ДНК из видов рода *Mentha* вместе с ДНК соочищается вещество, полностью ингибирующее ПЦР [2]. Более того, даже очистка ДНК с помощью центрифугирования в хлористом цезии не позволяет избавиться от ингибитора. В нашем случае мы использовали ДНК из *N. tabacum*, *P. sativum*, *T. vulgaris*, *B. oleracea*, *B. napus*, выделенную с использованием СТАВ. Во всех случаях мы получали примерно одинаковую эффективность амплификации, вполне достаточную для анализа трансгенных растений.

Таким образом, предлагаемые нами праймеры пригодны для анализа трансгенных растений практически любых видов, трансформированных любыми конструкциями, содержащими 35S промотор.

АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ
ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ: ПАРА УНІВЕРСАЛЬНИХ
ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ АМПЛІФІКАЦІЇ ПОСЛІДОВНОСТІ 35S ПРОМОТОРА

Резюме

Розроблено праймери для ампліфікації фрагмента послідовності 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Це дозволяє здійснювати аналіз трансгенних рослин, трансформованих будь-якою конструкцією, що містить 35S промотор. Показано можливість скринінгу трансгенних рослин ряду видів, серед яких *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum*, *Triticum vulgare*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*.

S. V. Storozhenko

ANALYSIS OF TRANSGENIC PLANTS USING POLYMERASE CHAIN REACTION:
THE PAIR OF UNIVERSAL PRIMERS FOR AMPLIFICATION
OF 35S PROMOTER SEQUENCE

Summary

The pair of primers for amplification of the 35S CaMV promoter sequence using polymerase chain reaction have been designed. The primers allow to carry out screening of transgenic plants transformed with any construction containing this promoter. A possibility to screen transgenic plants of several species including *N. tabacum*, *P. sativum*, *T. vulgare*, *B. oleracea*, *B. napus* has been showed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Erlich H. A. PCR technology: Principles and applications for DNA amplifications.— New York ; London : Stockton press, 1989.— 325 p.
2. Hammit J. D., Rounsley S., Spenser A. et al. The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies // Plant Cell Rep.— 1991.— 10, N 5.— P. 221—224.
3. Odell J. T., Nage F., Chua N.-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower 35S promoter // Nature.— 1985.— 313.— P. 810—812.
4. Sanders P. R., Winter J. A., Barnason A. R. et al. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants // Nucl. Acids Res.— 1987.— 15.— P. 1543—1558.
5. Murray M. J., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Ibid.— 1980.— 8, N 19.— P. 4321—4325.
6. Стороженко С. В., Шиша Е. Н., Глеба Ю. Ю. Трансформація рослин *Nicotiana tabacum* геном ДНК-топоізомеразы II типа *Drosophila melanogaster* // Біополімери і клітка.— 1993.— 9, № 1.— С. 26—31.
7. Berthomieu P., Meyer C. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR // Plant Mol. Biol.— 1991.— 17, N 3.— P. 555—557.
8. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A rapid and simple method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl. Acids Res.— 1991.— 19.— P. 1349.
9. Klimyuk V. I., Carroll B. J., Thomas K. C., Jones J. D. G. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis // Plant J.— 1993.— 3, N 3.— P. 493—494.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии
АН Украины, Киев

Получено 14.04.93