

УДК 631.547:581.19:633.521

З.Е. ГРУШЕЦКАЯ, В.А. ЛЕМЕШ, Л.В. ХОТЫЛЕВА  
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск  
E-mail: z.grushetskaya@igc.bas-net.by

## СОЗДАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И ВЫРОЖДЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ К ГЕНАМ *CesA* ЦЕЛЛЮЛОЗОСИНТАЗЫ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.)



Представители мультигенного семейства генов *CesA*, контролирующие синтез каталитических единиц целлюлозосинтазного комплекса, описаны у ряда высших растений. Установлено, что участок *HVR2* указанных генов является классоспецифичным и определяет участие продукта данного гена в синтезе первичной либо вторичной клеточной стенки. Целью настоящего исследования было создание вырожденных и специфических праймеров к участкам генов *CesA* льна, позволяющих получить молекулярные маркеры к классоспецифичной области *HVR2*. На основании анализа нуклеотидных последовательностей *EST CesA* льна и полных кДНК-последовательностей генов *CesA* арабидопсиса, тополя, кукурузы, хлопчатника из *GenBank* были созданы две пары специфических праймеров к фрагментам генов *CesA-1* и *CesA-6*, а также пара вырожденных праймеров к области *HVR2* всех *CesA*-генов льна. После амплификации кДНК льна были получены фрагменты ожидаемого размера (201 и 300 п.н. для *CesA-1* и *CesA-6*, и 600 п.н. для *HVR2* фрагмента соответственно). Созданные маркеры могут быть использованы для клонирования и секвенирования генов *CesA* льна, установления их количества, а также ткане- и стадийспецифичности.

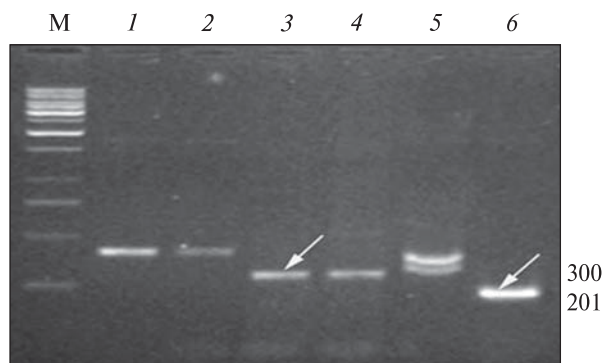
© З.Е. ГРУШЕЦКАЯ, В.А. ЛЕМЕШ, Л.В. ХОТЫЛЕВА, 2010

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2010. № 4

**Введение.** Вторичная клеточная стенка растений представляет собой каркас из сложных биополимеров и включает четыре основных химических компонента: гемицеллюлозу, пектин, целлюлозу и лигнин, причем преобладают в основном целлюлоза и лигнин. О путях биосинтеза лигнина известно сравнительно много [1], в то время как особенности регуляции синтеза целлюлозы и факторы, контролирующие количество и качество целлюлозной составляющей вторичной клеточной стенки, изучены недостаточно [2].

Основными генами, участвующими в синтезе целлюлозной составляющей клеточной стенки, являются гены целлюлозосинтазы (*CesA*) и группа целлюлозосинтазоподобных генов (*Csl*) [3, 4]. Гены *CesA* высших растений принадлежат к мультигенному семейству: в геноме арабидопсиса обнаружено 10 *CesA*-генов, риса и кукурузы – 12, ячменя – 8 и около 18 *CesA*-генов – в геноме тополя [5–7]. Установлено, что в образовании целлюлозосинтезирующего комплекса участвуют несколько различных *CESA* белков. Как минимум три *CesA*-гена транскрибируются одновременно. Это свидетельствует о том, что как минимум три различных белка целлюлозосинтазы принимают участие в формировании функционального целлюлозосинтезирующего комплекса. Показано, что в биосинтезе первичной и вторичной клеточной стенки участвуют продукты различных, строго определенных *CesA*-генов растений [8, 9].

В настоящее время в мировой базе данных депонировано более 1000 фрагментов кДНК *CesA*-генов злаковых, масличных, древесных и технических культур. Для всех белков *CESA* показана сходная доменная структура, состоящая из двух N-терминальных и шести C-терминальных трансмембранных доменов. В области *CesA*-гена, соответствующей N-терминальной области *CESA* протеина, находится первая из двух гипервариабельных областей *HVR1*, которая более консервативна среди *CesA* ортологов, чем среди паралогичных *CesA*-генов [6]. Вторая гипервариабельная область *HVR2* ограничена двумя консервативными субдоменами А и В и известна как классоспецифичная область. Она определяет, в синтезе первичной либо вторичной клеточной стенки упомянутая целлюлозосинтаза принимает участие [10, 11]. Показано, что нуклеотидные и аминокислотные последовательности *HVR2* области различных *CesA*-



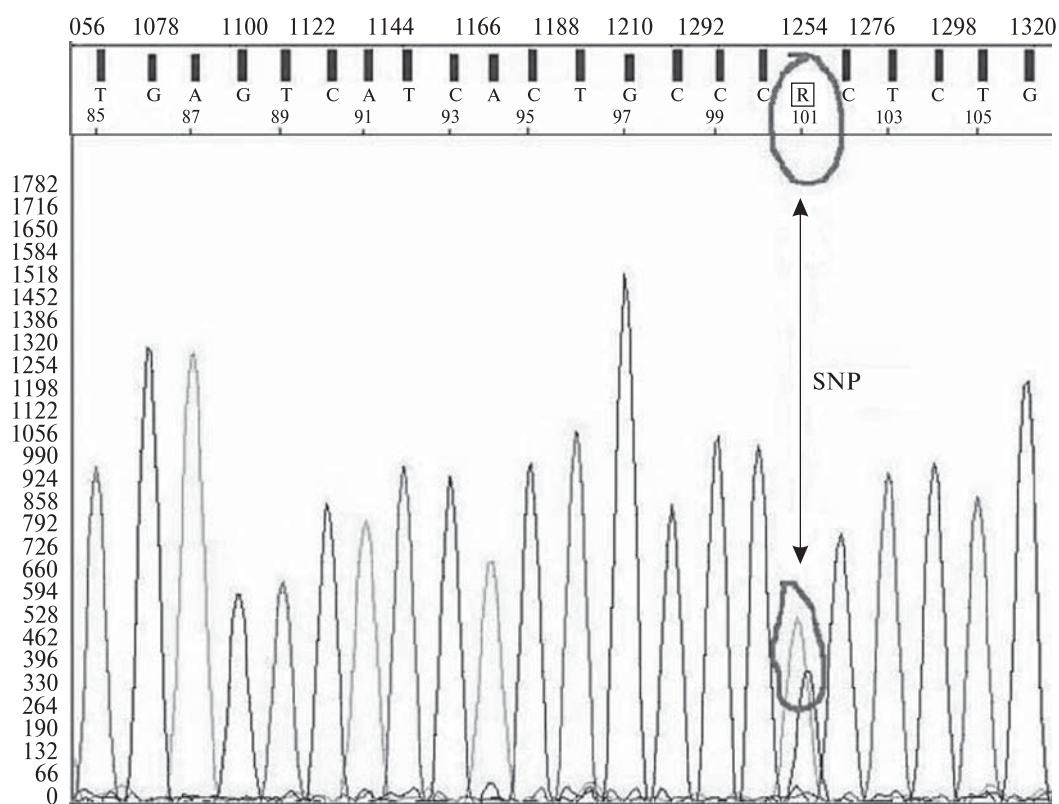
**Рис. 1.** ПЦР-фрагменты, полученные в результате амплификации ДНК и кДНК сортов льна Блакит (1, 3) и Ариан (2, 4–6) со специфическими *CesaA-6* (1–4) и *CesaA-1* (5, 6) праймерами: 1, 2, 5 – ДНК; 3, 4, 6 – кДНК, М – маркер молекулярного размера (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелки указывают кДНК-маркеры *CesaA*-генов ожидаемого размера, п.н.

генов и соответствующих им белков одного вида растений более изменчивы, чем HVRII область ортологичных *CesaA*-генов различных видов растений. Поскольку субдомены А и В,

фланкирующие HVRII область, отличаются высоким консерватизмом среди всех изученных до настоящего времени видов растений, к ним можно разработать универсальные вырожденные ПЦР-праймеры и амплифицировать переменный HVRII фрагмент *CesaA*-гена для любого вида растений.

Лен культурный (*Linum usitatissimum* L.) является удобной модельной системой для изучения фундаментальных процессов роста, дифференциации клеток и формирования клеточных стенок. Волокна льна – классический пример клеток, метаболизм которых ориентирован на масштабный синтез целлюлозы. Проблемы развития лубяных волокон важны и с практической точки зрения, так как удлинение клетки-волокон и формирование ее клеточных стенок (первичной и вторичной) напрямую связаны с качеством технического волокна, а от количества и строения волокнистых пучков зависят величина и качество урожая льна-долгунца [12].

Поскольку как общее количество *CesaA* генов льна, так и роль каждого из них в синтезе пер-

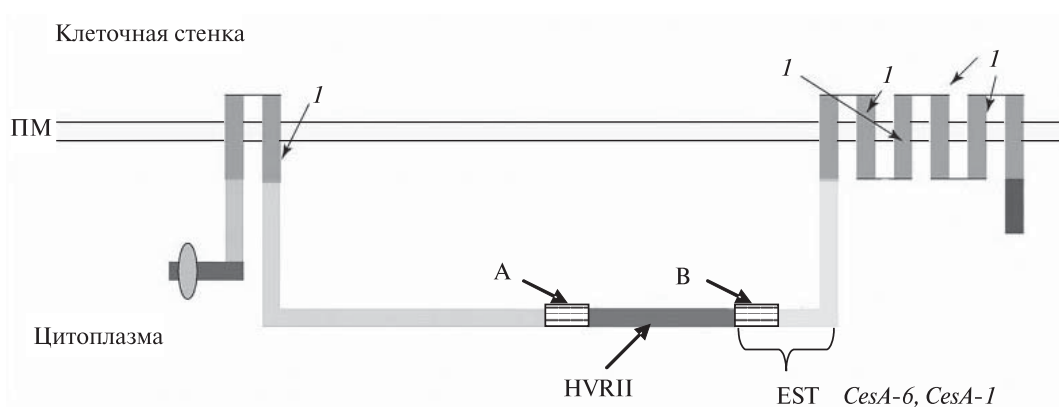


**Рис. 2.** Фрагмент нуклеотидной последовательности EST *CesaA-6*. Стрелкой показана область SNP

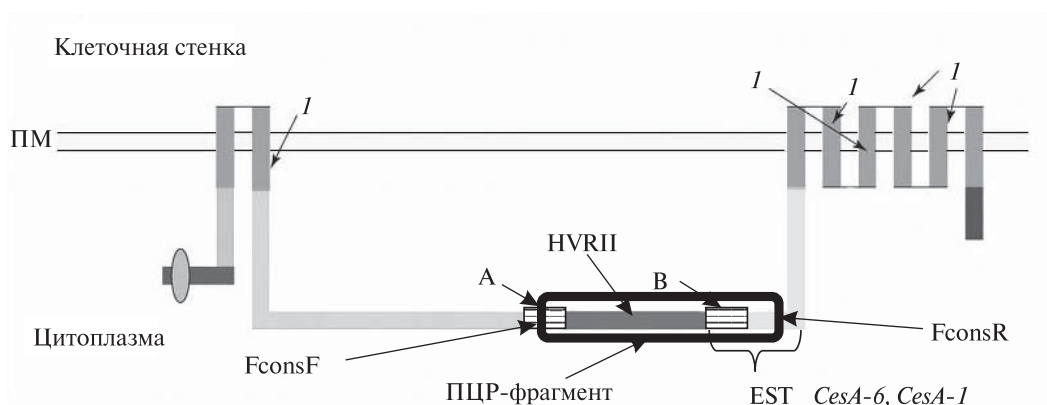
вичной либо вторичной клеточной стенки неизвестна, целью настоящего исследования было создание специфических молекулярных маркеров к известным фрагментам генов *CesA-1* и *CesA-6*, а также разработка вырожденных праймеров к классоспецифичной области HVRII целлюлозосинтазы льна на основе существующих EST (Expressed Sequence Tag) последовательностей *CesA*-генов растений.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служили сорта льна-долгунца Блакит (Беларусь) и Ариан (Франция) различного эколого-географического и генетического происхождения.

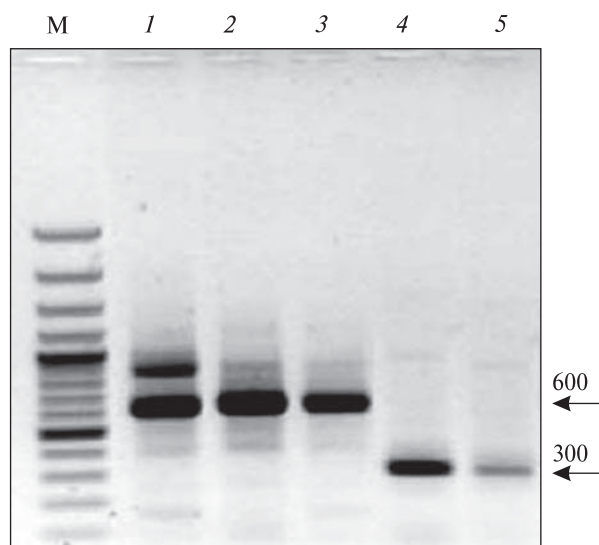
Выделение тотальной РНК проводили по методу Hegde et al. [13] из 100 мг ткани растений льна на стадии быстрого роста, когда происходит активный синтез как первичной, так и вторичной клеточной стенки льна [2]. Для мгновенной фиксации протекающих реакций образцы помещали в жидкий азот и хранили до выделения ДНК при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Синтез первой цепи кДНК осуществляли с помощью олиго-dT16-праймера на 10 нг тотальной РНК согласно протоколу, приведенному в RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва). С помощью программы Vector NTI Suite 7 были сконструированы



**Рис. 3.** Строение белка CESA на основе схемы Joshi et al. [16]: *I* – области, отвечающие за закоривание в плазматической мембране; HVRII – классоспецифичная область; А, В – консервативные домены, ограничивающие HVRII область; EST *CesA-6*, *CesA-1* – локализация полученной нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов *CesA-6*, *CesA-1* EST-локусов



**Рис. 4.** Строение белка CESA на основе схемы Joshi et al. [16]: *I* – области, отвечающие за закоривание в плазматической мембране; HVRII – классоспецифичная область; А, В – консервативные домены, ограничивающие HVRII область; EST *CesA-6*, *CesA-1* – локализация полученной нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов *CesA-6*, *CesA-1* EST-локусов; FconsF и FconsR – вырожденные праймеры, амплифицирующие ПЦР-фрагмент (заключен в рамку)



**Рис. 5.** ПЦР-фрагменты, полученные при амплификации кДНК льна сортов Блакит (1, 4) и Ариан (2, 3, 5) с вырожденными Fcons (1–3) и специфическими *CesA-6* (4, 5) праймерами; М – маркер молекулярной массы (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелки показывают размер полученных ПЦР-фрагментов, п.н.

рованы праймеры, специфичные к фрагменту кДНК субъединиц *CesA-1* и *CesA-6* льна, и вырожденные праймеры к HVRII области *CesA*-генов растений в целом:

**Нуклеотидные последовательности созданных праймеров**

F_A1_201	5'-AGTGGTTGGAACGATTTTCG-3'
R_A1_201	5'-CCCATTGCATCTCAAGGATA-3'
F_A6_302	5'-TTATTGCTGTCCAGAGAGAG 3'
R_A6_302	5'-AGAACCATATACTGGCAAGA-3'
F_consF	5'-TGYTAYGTNCARTTYCCDC-3'
F_consR	5'-CARTGCATYTTGAABCC-3'

Амплификацию кДНК осуществляли в реакционной смеси, включающей от 50 до 100 нг кДНК, по 0,25 mM прямого и обратного праймера, 0,2 mM каждого dATP, dCTP, dGTP, dTTP, от 1,5 до 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> и 1 ед. Taq-полимеразы в инкубационном буфере. Условия проведения реакции: денатурация – 4 мин при 95 °C; циклы 2–35 – 30 с при 94 °C, 30 с при 51–54 °C в зависимости от праймера и 1 мин при 72 °C; цикл 36 – 10 мин при 72 °C.

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с по-

мощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера 1 kb DNA ladder (BRL).

Секвенирование полученных ПЦР-продуктов проводили на секвенаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) по протоколу, приведенному в CycleReader Auto DNA Sequencing Kit («Fermentas», Литва).

**Результаты исследований и их обсуждение.**

На основании сравнения шести нуклеотидных последовательностей EST субъединиц *CesA* льна, зарегистрированных в GenBank (EF409998 – EF410000, EF214742 – EF214744), были сконструированы праймеры, специфичные к фрагменту кДНК определенной субъединицы *CesA*.

Амплификация кДНК растений льна на стадии быстрого роста со специфическими праймерами к генам *CesA-1* и *CesA-6* позволила идентифицировать фрагменты ожидаемого молекулярного размера (201 и 300 п.н. соответственно). В результате амплификации сконструированных праймеров с ДНК льна были получены более тяжелые продукты размером около 300 п.н. для *CesA-1* и 400 п.н. для *CesA-6*, что может свидетельствовать о наличии интрона в амплифицируемой области (рис. 1).

Идентичность полученных ПЦР-фрагментов ожидаемым EST-локусам была подтверждена секвенированием (рис. 2).

Сравнение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов *CesA*-генов с известными последовательностями *CesA*-генов арабидопсиса, тополя и эвкалипта [10, 14, 15] показало, что полученный ПЦР-фрагмент локализован в области консервативного домена В *CesA*-гена (рис. 3).

Поскольку полученные нуклеотидные последовательности фрагментов генов *CesA* льна относились к консервативной последовательности домена В, по ним невозможно было установить классоспецифичность исследуемых генов. Поэтому для получения всего спектра *CesA*-генов льна, экспрессирующихся в растении, нами были использованы вырожденные праймеры к HVRII области, разработанные Liang et al. [10] на основании сравнения нуклеотидных последовательностей *CesA*-генов различных видов растений. Однако, по-видимому,



из-за высокой степени вырожденности праймера был получен лишь минорный ПЦР-фрагмент ожидаемого размера (550 п.н.) на фоне значительного уровня неспецифической амплификации (данные не показаны). В связи с этим на основании анализа частично секвенированных нуклеотидных последовательностей фрагментов кДНК *CesA* генов арабидопсиса, риса, кукурузы, ячменя, тополя и других видов растений, полученных из GenBank, и сравнения их с известными EST-фрагментами *CesA*-генов льна, нами были разработаны собственные вырожденные праймеры к HVRII области генов целлюлозосинтазы льна (рис. 4).

Разработанные нами вырожденные праймеры Fcons амплифицируют на кДНК льна область размером 600 п.н., заключенную на рис. 4 в рамку. Полученный ПЦР-фрагмент включает HVRII область гена (550 п.н.) и соответствующий консервативному домену В *CesA*-гена фрагмент известной EST-последовательности льна (50 п.н.) (рис. 5).

Таким образом, на основании известных EST-последовательностей льна и полных нуклеотидных кДНК последовательностей *CesA*-генов арабидопсиса, тополя и эвкалипта разработаны праймеры к классоспецифичной области HVRII целлюлозосинтазы льна. Праймеры обладают достаточной степенью вырожденности для того, чтобы амплифицировать все экспрессирующиеся гены целлюлозосинтазы, и могут быть использованы для клонирования и секвенирования отдельных генов *CesA* льна, анализа их участия в синтезе первичной или вторичной клеточной стенки растения.

Z.E. Grushetskaya,

V.A. Lemesh, L.V. Khotyleva

DEVELOPMENT OF SPECIFIC AND DEGENERATED PRIMERS TO *CesA* GENES ENCODING FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.) CELLULOSE SYNTASE

Cellulose synthase catalytic subunit genes, *CesA*, have been discovered in several higher plant species, and it has been shown that the *CesA* gene family has multiple members. HVR2 fragment of these genes determine the class specificity of the CESA protein and its participation in the primary or secondary cell wall synthesis. The aim of this study was development of specific and degenerated primers to flax *CesA* gene fragments leading to obtaining the class specific HVR2 region of the gene. Two pairs of specific

primers to the certain fragments of *CesA-1* and *CesA-6* genes and one pair of degenerated primers to HVR2 region of all flax *CesA* genes were developed basing on comparison of six *CesA* EST sequences of flax and full cDNA sequences of Arabidopsis, poplar, maize and cotton plants, obtained from GenBank. After amplification of flax cDNA, the bands of expected size were detected (201 and 300 b.p. for the *CesA-1* and *CesA-6*, and 600 b.p. for the HVR2 region of *CesA* respectively). The developed markers can be used for cloning and sequencing of flax *CesA* genes, identifying their number in flax genome, tissue and stage specificity.

З.Є. Грушецька,

В.А. Лемеш, Л.В. Хотильова

СТВОРЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ТА ВИРОДЖЕНИХ ПРАЙМЕРІВ ДО ГЕНІВ *CesA* ЦЕЛЮЛОЗОСИНТАЗИ ЛЬОНУ (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

Представники мультигенної родини генів *CesA*, що контролюють синтез каталітичних одиниць целюлозосинтазного комплексу, описані у ряді вищих рослин. Встановлено, що ділянка HVR2 вказаних генів є класоспецифічною та визначає участь продукту даного гена в синтезі первинної або вторинної клітинної стінки. Метою дослідження було створення вироджених та специфічних праймерів до ділянок генів *CesA* льону, які дозволяють отримати молекулярні маркери до класоспецифічної області HVR2. На основі аналізу нуклеотидних послідовностей EST *CesA* льону та повних кДНК-послідовностей генів *CesA* арабідопсису, тополі, кукурудзи, бавовника з GenBank було створено дві пари специфічних праймерів до фрагментів генів *CesA-1* та *CesA-6*, а також пара вироджених праймерів до області HVR2 всіх *CesA*-генів льону. Після ампліфікації кДНК льону були одержані фрагменти очікуваного розміру (201 та 300 п.н. для *CesA-1* та *CesA-6*; 600 п.н. для HVR2 фрагмента відповідно). Створені маркери можуть бути використані для клонування та секвенування генів *CesA* льону, встановлення їх кількості, а також ткане- та стадієспецифічності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Boerjan W., Baucher M.R.J. Lignin biosynthesis // Ann. Rev. Plant Biol. — 2003. — 54. — P. 519.
2. Горшкова Т.А., Агеева М.В., Сальников В.В., Павленчева Н.В., Снегирева А.В., Чернова Т.Е., Чемикосова С.Б. Стадии формирования лубяных волокон *Linum usitatissimum* L. // Бот. журн. — 2003. — 88. — С. 1–11.
3. Pear J.R. et al. Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1996. — 93. — P. 12637–12642.
4. Burton R.A. et al. Virus-induced silencing of a plant

- cellulose synthase gene // *Plant Cell*.— 2000.— **12**. — P. 691–705.
5. Hazen S.P., Scott-Craig J.S., Walton J.D. Cellulose synthaselike genes of rice // *Plant Physiol*.— 2002.— **128**. — P. 336–340.
  6. Doblin M.S. et al. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes // *Plant Cell Physiol*.— 2002.— **43**. — P. 1407–1420.
  7. Burton R.A. et al. The *CesA* gene family of barley (*Hordeum vulgare*): quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes // *Plant Physiol*.— 2004.— **134**. — P. 224–236.
  8. Tanaka K. et al. Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes are required for cellulose synthesis in the secondary wall // *Plant Physiol*.— 2003.— **133**. — P. 73–83.
  9. Taylor N.G. et al. Interactions among three distinct *CesA* proteins essential for cellulose synthesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 2003.— **100**. — P. 1450–1455.
  10. Liang X., Joshi C. Molecular cloning of ten distinct hypervariable regions from the cellulose synthase gene superfamily in aspen trees // *Tree Physiol*.— 2004.— **24**. — P. 543–550.
  11. Vergara C.E., Carpita N.C. b-D-Glycan synthases and the *CesA* gene family: lessons to be learned from the mixed-linkage (1–3),(1–4) beta-D-glucan synthase // *Plant Mol. Biol*.— 2001.— **47**. — P. 145–160.
  12. Тихвинский С.Ф., Буторина Л.К. Борьба с полеганием сельскохозяйственных культур. — Л.: Колос, 1983. — 48 с.
  13. Hegde P. et al. A concise guide to cDNA microarray analysis // *BioTechniques*.— 2000.— **29**, № 3. — P. 548–562.
  14. Ranik M., Myburg A. Six new cellulose synthase genes from Eucalyptus are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis // *Tree Physiology*.— 2005.— **26**. — P. 545–556.
  15. Richmond T., Somerville C.R. The cellulose synthase superfamily // *Plant Physiol*.— 2000.— **124**. — P. 495–498.
  16. Joshi P., Mansfield S.D. The cellulose paradox— simple molecule, complex biosynthesis // *Curr. Opin. Plant Biol*. — 2007. — **10**. — P. 220–226.

Поступила 18.05.09