

ОСОБЛИВОСТІ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНА ЗЕЛЕНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БІЛКА (*gfp*) В РОСЛИНАХ ТЮТЮНУ ТА КУКУРУДЗИ МЕТОДОМ ПЛР

Палеха Д.Ю.¹, Нітовська І.О.²

¹ІНЦ "Інститут біології та медицини" КНУ ім. Тараса Шевченка, ydimona21@gmail.com

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143

Вступ. Репортерні гени, які полегшують візуалізацію та кількісне вимірювання трансгенного білка, використовують для визначення впливу умов трансформації на експресію трансгена. Одним із таких репортерних генів, що часто застосовують в дослідженнях з генетичної трансформації рослин, є ген зеленого флуоресцентного білку (GFP) медузи *Aequorea victoria*. Окрім гену дикого типу (*gfp*), в дослідженнях також використовують синтетичний (*pgfp*) та мутантний синтетичний ген, який має заміну серину на треонін (*S65Tpgfp*) чи на цистеїн (*S65Cpgfp*) в 65-й позиції гена *pgfp* [1]. Експресія синтетичних генів *gfp*, зазвичай приводить до більш яскравої флуоресценції порівняно з геном *gfp* дикого типу. Метою нашої роботи було дослідити виявлення гена *gfp* різних модифікацій у геномі трансгенних рослин тютюну та кукурудзи методом ПЛР.

Матеріали та методи. В дослідженні використовували ДНК трансгенних рослин тютюну сорту Petit Havana та кукурудзи гібриду F₁ КП7×ПРЖ5 української селекції, які були отримані в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослинного матеріалу за допомогою вектора pCB271 або pICH5290 [2]. Вектор pCB271 містив мутантний ген зеленого флуоресціюючого білку *S65Tpgfp*, тоді як Т-ДНК вектору pICH5290 мала в своєму складі ген *gfp* дикого типу.

Для аналізу наявності гену *gfp* в рослинній ДНК методом ПЛР використовували три пари праймерів (табл. 1). Праймери зберігались у вигляді розчинів концентратів 10 мМ у стерильному ТЕ буфері рН 8,0 при температурі – 20 °С.

Таблиця 1. Послідовність праймерів, використаних в дослідженні

Назва	Послідовність	Розмір амплікону п.н.
1F1R	5'-TGAGGCTCAAGTTGACATGC-3' 5'-TTCGTAGCAGCATCAAGGTG-3'	700
2F2R	5'-GACGTGAACG GCCACAAGTTCA-3' 5'-CGATG CGGTTCCACCAGGGTGT-3'	311
3F3R	5'-ATGCCACCTACGGAAAGCTC-3' 5'-GATGC GGTTCACCAGGGTAT-3'	263

Реакційна суміш для ПЛР (20 мкл) містила 0,5 одиниць FIREPol® ДНК-полімерази (Solis BioDyne, Естонія), 2 мкл 10× буферу В, 1,6 мкл 25 мМ MgCl₂,

200 мкМ кожного дНТФ, 0,5 мкМ кожного форвардного і реверсного праймера і 30 нг очищеної сумарної ДНК. Програма ампліфікації для виявлення гена *gfp* була задана наступним чином: денатурація 94°C – 4 хв, 34 цикли (денатурація 94°C – 30 с, ренатурація 56°C – 30 с, елонгація 72°C 45 с), завершення елонгації 72°C – 4 хв. Для пари праймерів 1F1R було використано стандартну програму без змін. При проведенні аналізу за допомогою пари праймерів 2F2R у програмі було збільшено температуру ренатурації до 59°C та зменшено час елонгації з 45 до 30 с. Для пари праймерів 3F3R температуру на етапі ренатурації було зменшено до 55°C, а час етапу елонгації до 20 с. Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 1,0% або 2,0 % агарозному гелі приготованому в 1xLB (lithium borate) буфері. Етидій бромід використовували для візуалізації ДНК. Для візуалізації ампліконів в гелі використовували джерело УФ–світла (Transilluminator 2011 Macrovue, Швеція) та фотоапарат Canon EOS 600D (Китай).

Результати та обговорення. При проведенні аналізу рослинної ДНК щодо присутності гена *gfp* методом ПЛР за допомогою трьох пар праймерів були отримані наступні результати.

Пара праймерів 1F1R взаємодіяла лише з геном *gfp* дикого типу. За допомогою цієї пари був виявлений амплікон потрібного розміру в ДНК трансгенного тютюну, отриманого за допомогою вектору рICN5290.

Пара праймерів 2F2R взаємодіяла з геном *gfp* різних модифікацій. Амплікони очікуваного розміру були візуалізовані як після аналізу ДНК трансгенних тютюну і кукурудзи, отриманих за допомогою вектора рСВ271, так і в ДНК тютюну, одержаного після трансформації вектором рICN5290. Ця пара праймерів краще взаємодіяла з ДНК рослин тютюну, ніж із зразками кукурудзи. При візуалізації в агарозному гелі в ультрафіолетових променях, амплікони, отримані в результаті аналізу ДНК тютюну, спостерігали з більшою інтенсивністю порівняно з ампліконами, отриманими при аналізі зразків кукурудзи. Це явище може бути пов'язано або зі спорідненістю праймерів 2F2R до інших ділянок геному кукурудзи, або з частковим порушенням доступу праймерів до нуклеотидної послідовності гена через, наприклад, його метилювання. Здійснення низхідної ПЛР приводило до покращення візуалізації амплікону очікуваного розміру, проте це покращення було незначним.

Пара праймерів 3F3R взаємодіяла лише з модифікованим мутантним геном *S65Tpgfp*, що знаходився в ДНК рослин тютюну, але майже не взаємодіяла зі зразками кукурудзи. Останній факт може вказувати на сильну спорідненість цієї пари праймерів до інших ділянок геному отриманих зразків кукурудзи. Також не спостерігали амплікону потрібного розміру при аналізі масиву рослинного матеріалу за допомогою цієї пари праймерів ДНК тютюну, яка містила ген *gfp* дикого типу. Оскільки очікуваний розмір амплікону при використанні пари праймерів 3F3R є невеликий (табл. 1) та може знаходитися занадто близько до загального переднього фронту низько молекулярної фракції в гелі, в дослідженні для покращення візуалізації ампліконів малого розміру було застосовано агарозні гелі з різною концентрацією агарози: 1 та 2 %. Збільшення концентрації гелю до 2 % дозволило краще візуалізувати отримані амплікони малого розміру.

Отже, кожна із досліджуваних пар праймерів по-різному взаємодіяла з досліджуваним геном *gfp*, який знаходився в ДНК рослин тютюну або кукурудзи. Використання пари праймерів 1F1R дозволило виявляти в геномі рослин тільки ген *gfp* дикого типу. За допомогою пари праймерів 3F3R можна було ідентифікувати лише мутантний синтетичний ген *S65Tpgfp*, що знаходився в ДНК тютюну, але не в зразках кукурудзи. Пара праймерів 2F2R виявилась універсальною, за допомогою якої можна було виявляти обидві модифікації гена *gfp* як в тютюні, так і в кукурудзи.

Висновки. В результаті проведеного дослідження було показано, що праймери до гена *gfp* можуть бути як вузько специфічні (за допомогою яких можна виявляти тільки одну модифікацію гена), так і універсальні (можна виявляти більше однієї модифікації гена). Так, наприклад, пари праймерів 1F1R (5'-TGA GGC TCA AGT TGA CAT GC-3' та 5'-TTC GTA GCA GCA TCA AGG TG-3') та 3F3R (5'-ATGCC ACCTA CGGAA AGCTC-3' та 5'-GATGC GGTTC ACCAG GGTAT-3') є вузько специфічними, за допомогою яких можна виявляти тільки ген *gfp* дикого типу, або мутантний синтетичний ген *S65Tpgfp* відповідно. Тоді, як пара праймерів 2F2R (5'-GACGT GAACG GCCAC AAGTT CA-3' та 5'-CGATG CGGTT CACCA GGGTG T-3') є універсальною і дозволяє виявляти в геномі рослин обидві модифікації гена *gfp*. Це знання може бути корисним при швидкому та дешевому скринінгу великих масивів отриманого рослинного матеріалу на присутність гена *gfp*, що часто використовується в біотехнології рослин як репортерний ген. Універсальні праймери дозволять швидко виявити всі модифікації гена в рослинному матеріалі, а вузько специфічні допоможуть з'ясувати походження трансгена.

Встановлено, що праймери можуть мати специфічність стосовно виду рослин. Так, наприклад, за допомогою пари праймерів 3F3R можна виявляти ген *S65Tpgfp* в ДНК тютюну, але не кукурудзи. Набуте знання допоможе уникнути хибних висновків стосовно відсутності трансгена в рослинному матеріалі, тоді, як насправді, він там може бути присутнім.

Знайдено універсальну пару праймерів 2F2R, за допомогою якої можна виявляти ген *gfp* різних модифікацій в рослинах тютюну та кукурудзи. Отримані знання є корисними без оптимізації векторних конструкцій та умов трансформації з метою отримання трансгенних рослин кукурудзи ліній та гібридів української селекції.

Список використаної літератури:

1. Pang S.-Z., DeBoer D.L., Wan Y., Ye G., Layton J.G., Neher M.K., Armstrong C.L., Fry J.E., Hinchey M.A., Fromm M.E. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 1996, 112(3):893-900.
2. Nitovska I.O., Vasylenko M.Yu., Morgun B.V. Effect of monocot introns on transgene expression in genus *Nicotiana* plants. // *Biotechnologia acta* - 1918. – N 4. – P. 69-79.