

ВИДІЛЕННЯ РНК ТА РЕАКЦІЯ ЗВОРотної ТРАНСКРИПЦІЇ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОЯВЛЕННЯ ТРАНСГЕНІВ У РОСЛИНАХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Л.М. КОЖЕМЯКІНА, аспірантка*

**Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків
НААН України**

Наведено результати досліджень із підбору методики виділення сумарної РНК з трансгенних рослин цукрових буряків із використанням двох підходів - методу фенольної екстракції та виділення РНК на силікатному сорбенті. Описано методику проведення реакції зворотної транскрипції з метою визначення експресії трансгенів у рослинах цукрових буряків.

Виділення РНК, полімеразна ланцюгова реакція, зворотна транскрипція, цукрові буряки

Нині генетична інженерія рослин є складовою сучасної молекулярної й клітинної біології, до головних завдань якої належать: генетична трансформація рослин, експресія перенесених генів та її регуляція у клітинах трансгенних рослин. Проте проблема варіабельності в експресії генів має важливе значення при вирощуванні трансформованих рослин [4, 5]. Зокрема, стабільність генетичних конструкцій у геномі трансгенних рослин цукрових буряків та їхня експресія вивчені недостатньо. Тому визначення ефективності проявлення трансгенів у рослинах цукрових буряків дуже актуальне. Одним із способів оцінки роботи вбудованих генів є метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), яка дає змогу встановити наявність специфічної РНК в клітинах трансгенних рослин.

Мета дослідження – підібрати методику екстракції тотальної РНК із трансгенних рослин цукрових буряків і провести реакцію зворотної транскрипції.

Матеріали і методи дослідження. Генетична конструкція толерантних до гліфосату цукрових буряків, яку вивчали, складається з 35S промотора, NOS термінатору і CP4 EPSPs гена (*5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene*). Рослинний матеріал для виділення тотальної РНК одержували методом культивування *in vitro* [2]. Стерильні рослини цукрових буряків були проаналізовані на наявність складових досліджуваної генетичної конструкції за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Екстракцію ДНК із листків асептичних рослин цукрових буряків здійснювали з використанням катіонного детергенту ЦТАБ (цетилтриметил-амоній бромід) [1]. При спектрофотометричному аналізі препаратів ДНК для проведення ПЛР відношення значень максимумів поглинання при довжинах хвиль 260/280 нм наближається до значення 1,8 [3].

У рослинах цукрових буряків 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти виявляли методом ПЛР із подальшим електрофоретичним розподілом

* Науковий керівник - кандидат біологічних наук Г.П., Петюх

продуктів реакції, використовуючи набір реактивів *GenPac GMO-35S PCR test* (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія). Для ідентифікації *NOS* термінатора і *CP4 EPSPs* гена у рослинах цукрових буряків використовували мультиплексну тест систему для ПЛР в реальному часі («Синтол», Росія).

Тотальну РНК із рослин цукрових буряків виділяли двома принципово різними способами - методом виділення РНК за допомогою фенолу та екстракцією РНК з використанням сорбенту [6, 7].

Екстракція РНК за допомогою фенолу. В роботі використовували набір реагентів *Trizol RNA Prep 100* (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія). Процедура виділення тотальної РНК складається з таких стадій: лізис клітин за наявності гуанідінтіоціанату і фенолу, очищення препарату РНК хлороформом та осадження нуклеїнової кислоти ізопропіловим спиртом. Як розчинник використовували ЕкстраГен Е.

Екстракція РНК за допомогою сорбенту. Для виділення сумарної РНК використовували комплект реагентів для виділення РНК «Рібо-сорб» (ТОВ «ІнтерЛабсервіс», Росія). При виділенні РНК за допомогою сорбенту проводили наступні етапи: лізис клітинних мембран, адсорбція РНК на силікатний сорбент при певному значенні рН і в присутності сольового буфера, відмивання РНК від білків та фенольних сполук спиртовими розчинами, видалення сорбенту й розчинення РНК у буфері.

Кількість та якість сумарної РНК оцінювали спектрофотометром. Препарат РНК вважається чистим, якщо показник фотометричної адсорбції на довжинах хвиль 260/280нм наближається до 2,8 [3].

Для одержання першого ланцюга комплементарної ДНК (кДНК) проводили реакцію зворотної транскрипції (ЗТ) за допомогою комерційного набору реагентів *GenPak® RT Core* (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія) згідно з методичними рекомендаціями виробника, використовуючи як матрицю одержану тотальну РНК. Реакційна суміш містила 100 од. зворотної транскриптази М-MLV, 20 од. інгібітору РНК-аз, випадкові гексануклеотидні праймери, дезоксинуклеозидтрифосфати та оптимізовану буферну систему для здійснення однієї стандартної реакції зворотної транскрипції [3]. Реакцію проводили в наступні етапи: ліофілізований вміст готової суміші розчиняли, додаючи по 5 мкл ЗТ розчинника (входить до складу набору), додавали по 5 мкл досліджуваних зразків РНК позитивного та негативного контролів; інкубували одержану суміш 40 хв при температурі 50°C, реакцію зупиняли внесенням у пробірки по 10 мкл стоп розчину (додавали до набору) та прогрівали при температурі 95°C протягом 10 хв. Позитивним контролем слугувала РНК, яка була виділена з нетрансгенних рослин цукрових буряків, а негативним - 5 мкл розчинника ЕкстраГен Е.

Результати дослідження та їхній аналіз. При одержанні стерильних проростків і вегетуючих рослин цукрових буряків ефективність стерилізації становила 96%, кількість життєздатних експлантів - 88%. Стерильні рослини використовували для виділення ДНК.

Для досліджуваних зразків концентрація ДНК була в межах 500 - 700 мг/мл, показник чистоти - 1,8 - 1,93. Отже, кількість та якість ДНК свідчать про те, що методика виділення ДНК із використанням катіонного детергенту ЦТАБ, дає змогу одержувати високоочищену ДНК, за допомогою якої можна проводити ПЛР із метою детекції послідовностей генетичної конструкції.

Візуалізацію продуктів реакції ампліфікації здійснювали шляхом електрофорезу в 2,5% - му агарозному гелі (рис. 1).

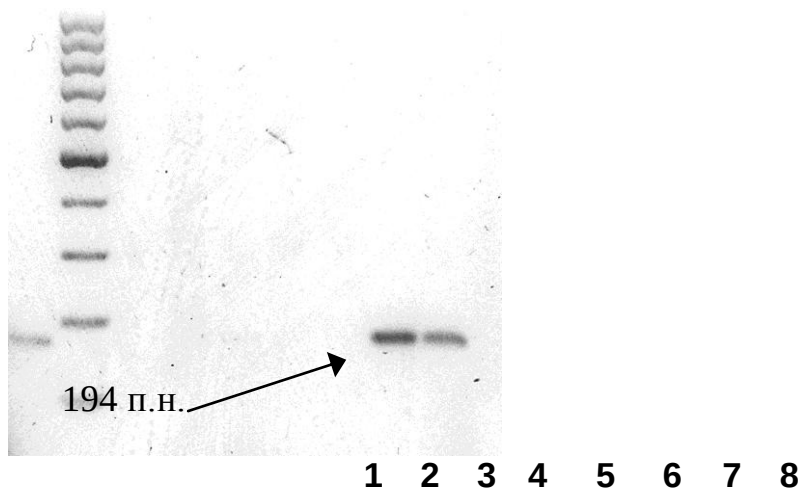


Рис. 1. Результати розподілу продуктів реакції ампліфікації в агарозному гелі: 1 - позитивний контроль; 2 - маркер молекулярної маси (*GeneRuler™ 100bp*); 3 - негативний контроль; 4 - 8 - досліджувані зразки ДНК.

У результаті електрофоретичного розділення продуктів реакції в агарозному гелі була встановлена наявність ампліконів розміром 194 п.н., які відповідають послідовності 35S промотору в контрольному позитивному зразку та у досліджуваних зразках, які відповідають трекам 7 і 8. Відсутність ампліконів зазначеного розміру на треку негативного контролю підтверджує достовірність одержаних даних та відсутність контамінації.

Результатом ПЛР-аналізу в реальному часі є графік флюоресценції досліджуваних зразків ДНК і цифрові дані порівняння графіків нагромадження продуктів ампліфікації (рис. 2).

B03	FAM	Neg Ctrl	OK-	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B04	FAM	Neg Ctrl	OK-	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B07	FAM	Pos Ctrl	ПК+	1	27,87	27,93	0,077	N/A
B08	FAM	Pos Ctrl	ПК+	1	27,98	27,93	0,077	N/A
F03	FAM	Unkn	HTp1/2	5	N/A	00,00	N/A	N/A
F04	FAM	Unkn	Trp1/1	6	N/A	00,00	N/A	N/A
F05	FAM	Unkn	Trp1/2	7	35,77	35,77	N/A	N/A
F06	FAM	Unkn	Trp3/1	8	38,64	38,64	N/A	N/A
F07	FAM	Unkn	Trp3/3	9	N/A	00,00	N/A	N/A
F08	FAM	Unkn	B. 1	10	N/A	00,00	N/A	N/A
B03	Cy5	Neg Ctrl	OK-	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B04	Cy5	Neg Ctrl	OK-	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B07	Cy5	Pos Ctrl	ПК+	1	27,46	27,51	0,064	N/A
B08	Cy5	Pos Ctrl	ПК+	1	27,55	27,51	0,064	N/A
F03	Cy5	Unkn	HTp1/2	5	35,56	35,56	N/A	N/A
F04	Cy5	Unkn	Trp1/1	6	36,67	36,67	N/A	N/A
F05	Cy5	Unkn	Trp1/2	7	33,66	33,66	N/A	N/A
F06	Cy5	Unkn	Trp3/1	8	35,91	35,91	N/A	N/A
F07	Cy5	Unkn	Trp3/3	9	41,72	41,72	N/A	N/A
F08	Cy5	Unkn	B. 1	10	38,69	38,69	N/A	N/A

Рис. 2. Числові значення порівняння графіків нагромадження продуктів ампліфікації для чотирьох зразків рослин цукрових буряків

Дані, наведені на рисунку 2 свідчать про наявність послідовностей ДНК NOS термінатора в двох зразках (35- й та 38-й порогові цикли за барвником FAM) і CP4 EPSPs гену в чотирьох зразках (порогові цикли за барвником Cy5 – відповідно 35, 36, 33 та 35-й).

На основі проведених досліджень були відібрані генотипи рослин цукрових буряків із різним складом генетичних конструкцій, які використовували для виділення РНК: зразки, що містять усі частини генетичної конструкції (35S промотор, NOS термінатор і CP4 EPSPs ген) та з відсутньою промоторною чи обома регуляторними послідовностями.

Виходячи з одержаних даних, найбільша кількість сумарної РНК була при використанні фенольної екстракції (500 - 900 мг/мл) за чистоти від 1,5 до 1,9. Концентрація РНК, одержаної з використанням сорбенту, становила 40-70 мг/мл, а показник чистоти - 1,8 - 2,0. Таким чином, чистота РНК при виділенні на сорбенті значно вища, ніж при фенольній екстракції (1,5 - 1,9). Але низька концентрація показує, що цей метод є менш прийнятним для виділення РНК із рослин цукрових буряків для реакції ЗТ.

Візуалізацію результатів реакції зворотної транскрипції проводили за допомогою електрофорезу в 1,5% - му агарозному гелі (рис. 3).

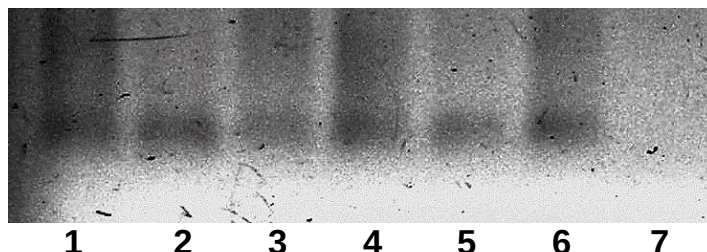


Рис. 3. Результати візуалізації продуктів реакції зворотної транскрипції в агарозному гелі:

**1 - позитивний контроль; 2-6 - кДНК досліджуваних зразків;
7 - негативний контроль.**

Про успішність реакції зворотної транскрипції свідчать відповідність треків досліджуваних трансгенних зразків цукрових буряків (№ 2 - 6) контрольному зразку (№ 1) та відсутність будь-яких продуктів реакції на треку негативного контролю (№ 7), що дало змогу стверджувати, про достовірність одержаних даних і виключити можливість контамінації.

Висновки. У результаті здійснених досліджень була сформована вибірка з генотипів трансгенних рослин цукрових буряків із різними варіантами складу інтродукованої конструкції, що включали корисний ген. Одержані дані свідчать, що при виділенні РНК з трансгенних рослин цукрових буряків для проведення реакції зворотної транскрипції найкращим є фенольний метод екстракції, оскільки він передбачає додаткове очищення нуклеїнових кислот від білків і фенольних сполук. Таким чином, одержані кДНК дають змогу оцінити ефективність експресії генів інтересу за допомогою ПЛР.

Список літератури

1. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / [под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена]. – М. : Мир, 1991. – 408 с.
2. Головка А.Е. Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.) в культурі *in vitro*: регенерація, морфогенез і генетична трансформація : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / А.Е. Головка. – К. : Ін-т клітинної біології та генетичної інженерії. – 2003. – 20 с.
3. Епринцев А.П. Идентификация и исследование экспрессии генов / А.П. Епринцев, В.Н. Попов, Д.Н. Федорин – Воронеж, 2008. – 64 с.
4. Левенко Б. Трансгенні культури у світі та Україні / Б. Левенко // Вісн. НАН України. – 2011. – № 9. – С. 31–41.
5. Тищенко Е.Н. Экспрессия трансгенов, проблемы и стратегии для практического применения / Е.Н. Тищенко, Б.В. Моргун // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т. 36. - №4. – С. 279–291.
6. Chomczynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Analytical biochemistry – 1987. – Vol. 162. – P. 156 - 159.

7. Logemann J. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues / J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer // Anal. Biochem. – 1987. – Vol.163. – № 1. – P. 16–20.

Приведены результаты исследований по подбору методики выделения суммарной РНК из трансгенных растений сахарной свеклы с использованием двух подходов: метода фенольной экстракции и выделения РНК на силикатном сорбенте. Описана методика проведения реакции обратной транскрипции с целью определения экспрессии трансгенов в растениях сахарной свеклы

Выделение РНК, полимеразная цепная реакция, обратная транскрипция, сахарная свекла

The results of research on the selection of allocation methods of total RNA from transgenic sugar beet plants using two approaches: the method of phenol extraction and RNA isolation for silicate sorbent. Described method of reverse transcription reaction in order to determine the expression of transgenes in plants of sugar beet.

RNA isolation, polymerase chain reaction, reverse transcription, sugar beet