

УДК 577.21

СОЗДАНИЕ БИБЛИОТЕКИ кДНК ИЗ МЕРИСТЕМЫ МЕТЕЛКИ ПАЛЬЧАТОГО ПРОСА

В. РАДЧУК¹, Я.В. ПИРКО², С.В. ИСАЕНКОВ², А.И. ЕМЕЦ², Я.Б. БЛЮМ²

¹ Институт генетики растений и исследований культурных растений, Гатерслебен, Германия

² Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

*Апробирован протокол получения полноразмерной кДНК на основе набора SuperScript® Full-Length cDNA Library Construction Kit II («Invitrogen», США) и создана высококачественная библиотека кДНК из меристематической ткани метелки пальчатого проса (*Elysiine sorasana* (L.) Gaertn). Средний титр полученной библиотеки кДНК составил $3,01 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, средняя длина вставки – около 1070 пар оснований, средняя эффективность встраивания кДНК фрагментов – 99,5%. Проведено выборочное секвенирование клонов созданной библиотеки кДНК. Последовательности кДНК клонов идентифицированы с помощью BLAST поиска. Результаты анализа библиотеки кДНК и выборочного секвенирования свидетельствуют о хорошей функциональности и полноразмерности вставок кДНК клонов. Библиотека кДНК меристемы метелки пальчатого проса представляет собой хороший и надежный источник выделения и идентификации ключевых генов метаболизма и развития меристемы, а также получения новых генетических маркеров для проведения генетических исследований и молекулярной селекции.*

Ключевые слова: пальчатое просо, меристема, библиотека кДНК, секвенирование фрагментов кДНК.

Введение. Клонирование популяций мРНК из различных тканей растений является эффективным методом идентификации и характеристики новых генов, вовлеченных в регуляцию различных биохимических и физиологических процессов. Для того чтобы провести тканеспецифическое транскрипционное профилирование, необходимо изолировать мРНК из отдельных тканей. Наличие библиотеки кДНК

значительно облегчает процесс изолирования и идентификации генов. Как правило, библиотеки кДНК включают в себя только часть генетической информации клетки и отображают текущий транскрипционный статус клетки, ткани или организма в целом. Последовательности кДНК получают в результате реакции обратной транскрипции на матрице мРНК. Несмотря на преимущества такой методики, она также имеет и недостатки. Иногда молекулы синтезированной кДНК содержат не только кодирующие последовательности, но и фрагменты некодирующей ДНК или интроны. Молекулы кДНК из-за преждевременной остановки обратной транскрипции могут состоять из неполных кодирующих последовательностей [1]. От совокупности всех перечисленных факторов зависит качество и функциональность создаваемых библиотек кДНК. Поэтому четкий контроль процесса синтеза кДНК и анализ кДНК транскриптов является одним из главных условий создания качественной библиотеки кДНК.

Выборочное секвенирование фрагментов кДНК позволяет получить важную информацию о генетической составляющей видов, чей геном еще не был секвенирован [2]. Поэтому создание высококачественных библиотек кДНК сельскохозяйственных видов растений является важным направлением современной молекулярной генетики и, соответственно, геномики. В частности, объектами геномики растений все чаще становятся недостаточно используемые так называемые «сиротские» (ог-

© В. РАДЧУК, Я.В. ПИРКО, С.В. ИСАЕНКОВ,
А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2014

phan) сельскохозяйственные культуры, в том числе и пальчатое просо (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) [3, 4].

Пальчатое просо (дагусса или раги) является традиционной зерновой культурой в странах Северной Африки, Индии и Азии [3, 5, 6]. Из зерна дагуссы получают муку и даже производят пиво [5, 6]. Возделывание пальчатого проса имеет ряд перспектив и в климатических условиях Украины, поскольку дагусса является не только ценной зерновой культурой, но может использоваться в качестве перспективного продуцента биомассы для дальнейшего получения фуража и биоэтанола [7, 8]. В связи с этим украинскими селекционерами созданы новые высокопродуктивные сорта пальчатого проса [9–11], в том числе и с использованием биотехнологических подходов, базирующихся на получении соматоклональных вариантов [10–13].

Пальчатое просо засухоустойчиво, нетребовательно к почве, высокоурожайно. Более того, это растение обладает устойчивостью ко многим видам заболеваний и фитопатогенов, благодаря чему пальчатое просо становится объектом пристального внимания все более широкого круга исследователей. Следовательно, *E. coracana* является перспективным источником для поиска и изолирования новых генов, кодирующих важные сельскохозяйственные признаки, и для использования в селекционном процессе с привлечением методов молекулярной генетики, а также улучшения других видов злаков методами генетической инженерии. С помощью дегенеративных праймеров уже было изолировано из дагуссы несколько R-генов, определяющих устойчивость к некоторым фитопатогенам [14]. Именно поэтому целью настоящего исследования было создание высококачественной библиотеки кДНК из меристематических тканей метелки пальчатого проса нового высокоурожайного сорта Ярослав-8 (соматоклональный вариант SE7) для дальнейшего использования в поиске новых полезных генов и генетических маркеров [10, 15].

Материалы и методы. *Растительный материал.* Растения пальчатого проса сорта Ярослав-8 выращивали в условиях теплицы, и для выделения РНК отбирали растения на ранней стадии развития метелки [15]. Для этого из

развивающихся метелок пальчатого проса изолировали участки меристематической ткани.

Изолирование РНК. Около 100 мг меристематической ткани развивающихся метелок измельчали в жидком азоте в керамической ступке с помощью пестика, добавляли 1 мл TRIzol («Invitrogen», США), подогретого до 60 °С, и инкубировали на протяжении 5 мин. После этого образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 g и 4 °С. Супернатант переносили в новую микроцентрифужную пробирку, перемешивали с 0,2 мл хлороформа в течение 2 мин и центрифугировали 10 мин при 10 000 g и 4 °С. После центрифугирования водную фазу переносили в новые микроцентрифужные пробирки, перемешивали с 0,6 объемами изопропанола, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 g и 4 °С. Осадок промывали холодным раствором 70%-ного этанола и растворяли в 100 мкл стерильной дистиллированной воды. Изолированную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой («Qiagen», Германия), очищали с помощью набора для выделения РНК (RNeasy plant mini kit) («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в денатурирующем агарозном геле. Количество РНК определяли спектрофотометрически [16].

Синтез одноцепочечной кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы SuperScript® III («Invitrogen», США). К 10 мкг РНК добавляли сначала воду, обработанную диэтилпирокарбонатом (ДЭПК), до объема 25,5 мкл, а затем 2 мкл 3'-праймера (1,5 мкг/мкл) (5'-биотин-GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAG-TTGGG(T)22VN-3'), содержащего последовательность attB2. В дальнейшем смесь инкубировали на протяжении 7 мин при температуре 70 °С. После понижения температуры до 45 °С (каждый шаг – 0,1 °С) с помощью ПЦР-машины к смеси праймера и РНК добавляли 10 мкл 5 × First Strand Buffer, 5 мкл 0,1 М ДТТ, 2,5 мкл 10 мМ дНТФ, 5 мкл обратной транскриптазы SuperScript® III (200 ед./мкл), предварительно охлажденной на льду, а затем термостатированной при 45 °С в течение 2 мин. Реакцию синтеза одноцепочечной кДНК проводили пу-

тем термостатирования при следующем режиме: 45 °С – 20 мин, 50 °С – 30 мин, 55 °С – 30 мин. После завершения реакции синтеза кДНК к реакционной смеси добавляли 1 мкл гликогена (20 мкг/мкл), 25 мкл 7,5 М NH₄OAc и 187 мкл 100%-ного этанола. Раствор оставляли на 1 ч при –80 °С, а в дальнейшем его центрифугировали 30 мин при 16 000 g и 4 °С. Осадок дважды переосаждали при 16 000 g (4 °С) в 70%-ном растворе этанола в течение 2 мин. Высушенный на протяжении 10–15 мин при комнатной температуре осадок растворяли в 179 мкл воды, обработанной ДЭПК, тщательно перемешивали пипеткой и центрифугировали в течение 2 с для осаждения капель раствора.

Отбор полноразмерной кДНК и лигирование адаптеров. Для разрушения РНК-ДНК гибридов раствор синтезированной одноцепочечной кДНК 30 мин обрабатывали РНКазой I (100 ед./мкл) при 37 °С. Очистку кДНК от РНКазы I проводили, смешивая 200 мкл смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25:24:1) и реакционной смеси с РНКазой I, затем инкубировали в течение 20 мин. Впоследствии полученную смесь центрифугировали на протяжении 5 мин при 16 000 g. Водную фазу отбирали в новую микроцентрифужную пробирку и добавляли 1 мкл гликогена (20 мкг/мкл), 90 мкл 7,5 М NH₄OAc и 675 мкл 100%-ного этанола для дальнейшего переосаждения кДНК. Пробирки со смесью инкубировали в течение 1 ч при –80 °С и центрифугировали 30 мин при 4 °С. Осадок дважды центрифугировали в течение 2 мин при 4 °С в 150 мкл раствора 70%-ного этанола. Осадок, высушенный на протяжении 10 мин при комнатной температуре, растворяли в 300 мкл ТЕН-буфера («Invitrogen», США) и оставляли для инкубирования на льду.

Полноразмерные кДНК отбирали с помощью антител к кэп-структуре кДНК. Подготовленные магнитные микросферы с кэп-антителами смешивали с раствором кДНК и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор кэп-микросфер и кДНК дважды промывали с помощью магнитного разделителя частиц Magna-Sep™ («Invitrogen», США), каждый раз удаляя супернатант и ресуспендируя осадок в 300 мкл нового ТЕН-буфера.

В дальнейшем в пробирку добавляли 100 мкл 1 М Трис-НСl (рН 7,0) и помещали в магнит-

ный разделитель частиц Magna-Sep™ на 1 мин, чтобы удалить супернатант, после чего к осадку добавляли 100 мкл 50 мМ NaOH и инкубировали 10 мин при 37 °С. Элюировали кДНК с помощью инкубации на магнитном разделителе частиц Magna-Sep™ в течение 1 мин и последующего отбора супернатанта в заранее приготовленную пробирку со 100 мкл 1 М Tris-НСl (рН 7,0) для нейтрализации NaOH. Элюцию повторяли трижды. Общий объем собранной кДНК составил 400 мкл.

Последующую очистку кДНК проводили на колонке Spin Column, которую предварительно помещали в пробирку объемом 2 мл. Колонку центрифугировали при 8100 g в течение 1 мин. Колонку промывали дважды 400 мкл промывочного буфера, центрифугируя в течение 1 мин при 8100 g и вторично при 16 000 g. Колонку помещали в новую микроцентрифужную пробирку, добавляли по центру колонки 12 мкл дистиллированной воды, обработанной ДЭПК, и инкубировали в течение 1 мин. Затем колонку центрифугировали 1 мин при 16 000 g. Процесс элюции кэпированной кДНК повторяли еще один раз. Очищенную кДНК сшивали с 5'-AttB1 адаптером праймеров. Для проведения этой реакции к 22 мкл очищенной кДНК добавляли 10 мкл 5 × Adapter Buffer, 5 мкл 5'-Adapter Mix (0,5 мкг/мкл), 8 мкл 0,1 М ДТТ, 5 мкл T4 ДНК-лигазы (1 ед./мкл) и инкубировали 24 ч при 16 °С. Связавшуюся с 5'-адаптером кДНК очищали при помощи колонок для очистки, предварительно отцентрифугированных 1 мин при 10 000 g. К реакционной смеси добавляли 50 мкл связывающего буфера и 50 мкл 100%-ного этанола. Приготовленную смесь наносили на колонки для очистки и центрифугировали в течение 1 мин при 8100 g. Жидкость, прошедшую через колонку, удаляли и наносили на колонку 200 мкл промывочного буфера. Колонки центрифугировали 1 мин при 16 000 g. После промывки колонок их переносили в новые микроцентрифужные пробирки (1,5 мл). После нанесения 40 мкл воды, обработанной ДЭПК, и инкубирования в течение 1 мин колонки центрифугировали 1 мин при 16 000 g. Эту процедуру повторяли еще один раз.

Синтез и отбор фрагментов двухцепочечной кДНК и их клонирование в вектор pDONR™ 222. Для синтеза комплементарной цепи кДНК к

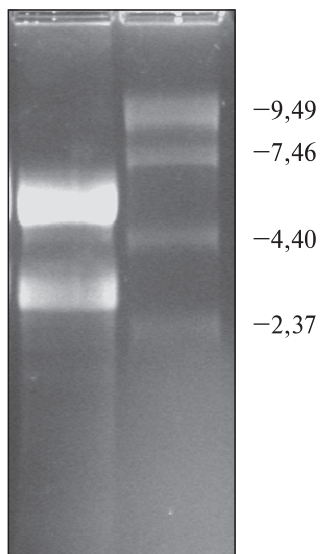


Рис. 1. Электрофореграмма РНК (слева), выделенной из меристем метелок пальчатого проса. Справа – молекулярный РНК маркер (в тысячах пар оснований, тпн)

79 мкл кДНК с 5'-адаптером добавляли 10 мкл 10 × High Fidelity PCR буфера, 4 мкл 10 мМ дНТФ, 5 мкл 50 мМ MgSO₄, 1 мкл 5'-прайма (100 нг/мкл), комплементарного 5'-attB1, 1 мкл Platinum® Taq ДНК-полимеразы (Taq DNA Polymerase High Fidelity, «Invitrogen», США). Смесь хорошо перемешивали и ставили в машину для ПЦР со следующей программой: 20 мин при 68 °С, 20 мин при 72 °С, затем охлаждали до 4 °С. После этого кДНК разделяли с помощью хроматографических колонок, заполненных 1 мл сефакрила (Sephacryl® S-500 HR, «Invitrogen», США). Первую фракцию элюата собирали в подготовленную пробирку. Затем на колонку наносили следующие 100 мкл TEN буфера. Элюат собирали в ту же самую пробирку. При нанесении следующих 240 мкл TEN буфера элюат собирали в следующую пробирку. Последнюю фракцию фрагментов кДНК смывали в третью пробирку с помощью нанесения 80 мкл TEN буфера. В идеале, во вторую пробирку собирают наиболее длинные фрагменты кДНК (>500 п.н.), поэтому кДНК из этой пробирки переосаждали и растворяли в 7 мкл TEN буфера (выход кДНК 325 нг). Первую и третью пробирки сохраняли при -20 °С в качестве резерва. Реакцию рекомбинации кДНК с донорным вектором проводили в соответствии с рекомендациями производителя («Invitrogen», США). Полученная attB-фланкированная кДНК была вставлена в вектор pDONR™222 с помощью BP Clonase® II («In-

vitrogen», США). После инкубации в течение 20 ч при 25 °С реакцию останавливали путем инактивации BP клоназы, добавляя протеиназу К («Invitrogen», США) с последующим инкубированием 10 мин при 37 °С. Реакционную смесь осаждали 98%-ным этанолом и растворяли в 10 мкл воды, обработанной ДЭПК.

Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК и установление среднего титра библиотеки. Трансформацию компетентных клеток *E. coli* ElectroMAX™ DH10B™ («Invitrogen», США) (F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG tonA) осуществляли с помощью электропорации, добавляя к 50 мкл компетентных клеток 2,5 мкл плазмидной ДНК. Электропорацию проводили при 2,2 кВ, 200 Ом, 25 мкФ с помощью электропоратора BioRad Gene Pulser® II («BioRad», США). В дальнейшем клетки инкубировали, интенсивно перемешивая на шейкере (250 об./мин) в течение 1 ч при температуре 37 °С. Для дальнейшего хранения библиотеки кДНК в кельвинаторе при -80 °С к каждой пробирке с компетентными клетками добавляли равный объем 40%-ного глицерина в среде SOC. Из пробирок с кДНК клонами и плазмидой pUC19 (контроль) отбирали по 100 мкл смеси для приготовления серий из разведений и определения титра библиотеки.

Титр библиотеки кДНК определяли с помощью двукратного высева 100 мкл каждой из аликвот с разведениями (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) отобранной смеси *E. coli* с плазмидными клонами кДНК или pUC19 (10⁻²) на чашки Петри с ЛБ агаром, содержащим канамицин (50 мкг/мл) для клонов в плазмиде pDONR™222 или ампициллин (100 мкг/мл) для клонов в плазмиде pUC19. Затем подсчитывали количество колоний на чашках с различными разведениями и определяли средний титр библиотеки кДНК [16].

Из случайных колоний *E. coli* библиотеки кДНК выделяли плазмидную ДНК [16]. После дополнительной очистки плазмидной ДНК часть клонов секвенировали с помощью стандартных M13 праймеров. Среднюю величину вставки библиотеки кДНК в плазмиде определяли реакцией рестрикции ферментом BsrGI.

Результаты исследований и их обсуждение. Для получения кДНК достаточно 5–10 мкг высоко-

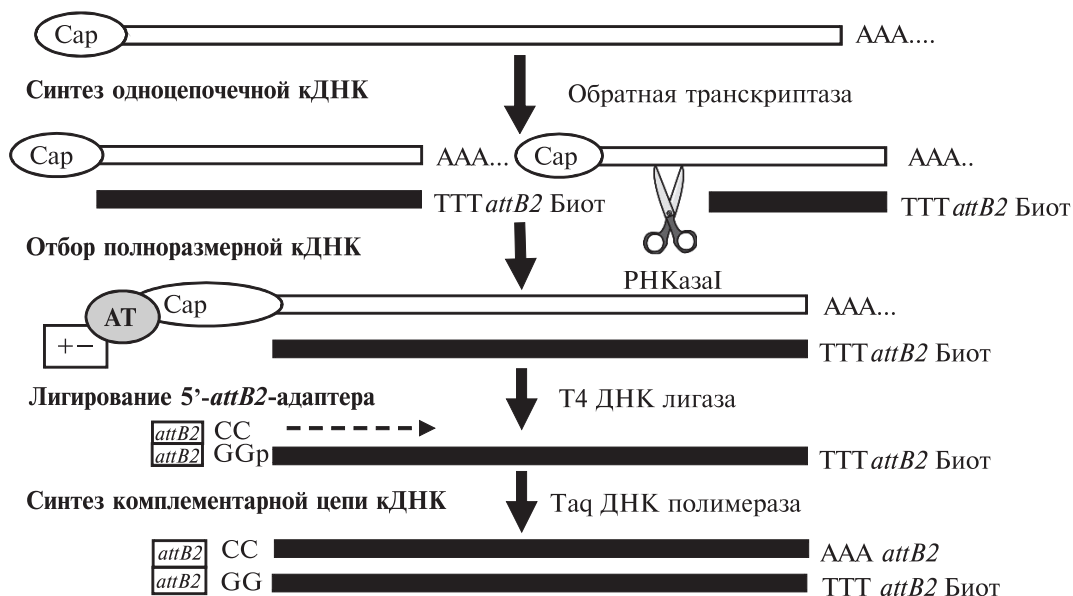


Рис. 2. Схема синтеза и отбора кДНК для дальнейшего клонирования в pDONR™ 222 («Invitrogen», США). Полосой, окрашенной в белый цвет, обозначена мРНК, в черный – кДНК

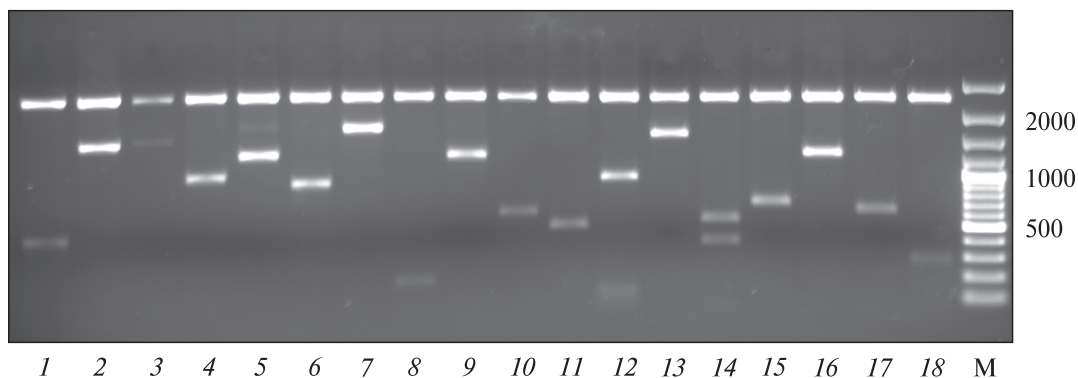


Рис. 3. Оценка эффективности рекомбинации и определение среднего размера вставки: 1–18 – клоны, из которых выделяли плазмидную ДНК и обрабатывали рестриктазой BsrG I; М – молекулярный маркер

Особенности последовательностей, полученных при секвенировании, и результаты BLAST поиска

| Сходство | Score | Значение | Номер в базе данных |
|--|-------|----------|---------------------|
| Катепсин Б (<i>Setaria italica</i>) | 426 | 1e-146 | XP_004978407.1 |
| 1-дезоксид-Д-ксилозы-5-фосфатредуктоизомераза (<i>Setaria italica</i>) | 288 | 8e-83 | XP_004967950.1 |
| 2-дезоксид-Д-ксилозы-5-фосфатредуктоизомераза (<i>Setaria italica</i>) | 287 | 2e-92 | XP_004967950.1 |
| 40S рибосомальный белок S3 (<i>Setaria italica</i>) | 459 | 5e-162 | XP_004972758.1 |
| Уриказа (<i>Triticum urartu</i>) | 412 | 5e-143 | EMS57616.1 |

качественной РНК, поскольку из такого количества РНК можно получить 10^6 – 10^7 клонов *E. coli*. Поэтому выделение тотальной РНК осуществляли с использованием TRIzol. В дальнейшем соблюдение этих условий гарантирует получение высококачественной библиотеки кДНК. Для того чтобы избежать загрязнения ДНК, которая может также встраиваться в клонируемый вектор и загрязнять библиотеку кДНК, выделенную РНК дополнительно обрабатывали ДНКазой, а затем очищали от фермента на специальных колонках. Качество полученной РНК проверяли в 1%-ном денатурирующем агарозном геле (рис. 1), а затем использовали для синтеза библиотеки кДНК.

Библиотека кДНК создана на базе набора SuperScript® Full-Length cDNA Library Construction Kit II (Invitrogen) (схема создания библиотеки изображена на рис. 2). Синтез одноцепочечной кДНК проводили с помощью специального биотинилированного политимидинового праймера (*attB2-dT22VN*). Биотинилирование праймера способствует блокированию лигирования тупыми концами 5'-адаптеров к 5'-концу одноцепочечной кДНК в процессе лигирования адаптеров. В состав 3'-политимидинового (*attB2-dT22VN*) праймера также входит *attB2* последовательность, которая отвечает за реакцию рекомбинации. Применение специальных антител против 5'-кэпов мРНК позволяет отбирать полноразмерные кДНК последовательности, поскольку только в них присутствует сигнальная кэп-структура для старта транскрипции. Таким образом, использование такой технологии обеспечивает отбор полноразмерных и функциональных последовательностей кДНК (рис. 2).

Присоединение 5'-адаптера, содержащего *attB1* сайт рекомбинации, обеспечивает дальнейшую рекомбинацию кДНК фрагмента в вектор рDONR™ 222 [17, 18]. Поэтому при синтезе второй цепи все последовательности кДНК являются уже фланкированными последовательностями *attB*. Такая схема синтеза двухцепочечной кДНК позволяет избежать последующей ПЦР амплификации и, следовательно, артефактов, связанных с ее проведением. Таким образом, благодаря уникальной системе сайт-специфичной рекомбинации фланкированные последовательностями *attB* молекулы

кДНК вставляются непосредственно в донорный вектор с последовательностями *attP* (рDONR™222) без применения каких-либо ферментов рестрикции, лигирования и дефосфорилирования [19].

После трансформации электрокомпетентных клеток ElectroMAX™ DH10B™ произвели оценку среднего титра полученной библиотеки кДНК, которая составила $3,01 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Оценка эффективности встраивания двухцепочечной кДНК в вектор составила 99,5 %, как следует из результатов рестрикционного анализа 196 колоний. Средняя длина вставки кДНК была около 1070 пар нуклеотидов (рис. 3), что соответствует средней длине мРНК. Результаты анализа указывают на высокое качество библиотеки кДНК, поскольку библиотека имеет очень высокий средний размер вставки и почти 100%-ную эффективность встраивания кДНК последовательностей по сравнению с другими методами и стратегиями создания библиотек кДНК [20, 21]. Как следует из выборочного секвенирования встроенных фрагментов кДНК, почти каждый клон библиотеки несет в себе полноразмерную вставку кДНК (таблица). Поскольку изучение генома пальчатого проса только началось, большинство про-секвенированных клонов кДНК отсутствуют в открытых базах данных. Из-за филогенетического родства наиболее высокий уровень гомологии последовательности кДНК пальчатого проса проявляют с последовательностями кДНК могоара (*Setaria italica*) и генами дикой пшеницы (*Triticum urartu*) (таблица).

Выводы. В результате проделанной работы получена высококачественная библиотека кДНК из меристематических тканей метелки пальчатого проса, содержащая полноразмерные транскрипты почти в 100 % клонов. Использование эффективной системы клонирования фрагментов кДНК посредством рекомбинации Gateway позволило избежать получения большого количества химерных и пустых клонов. Такая система хранения кДНК в донорных векторах Gateway позволяет очень легко и быстро переносить последовательности кДНК в различные векторы назначения (destination vectors) с помощью рекомбинации для дальнейшей экспрессии рекомбинантных белков или функционального анализа. Созданная библиотека кДНК из кле-

ток меристемы метелки пальчатого проса есть первой и удобной коллекцией кодирующих последовательностей ДНК из этого растения. В результате того, что геном дагуссы еще не расшифрован, созданная библиотека является весьма полезным и своевременным ресурсом для поиска новых генов и генетических маркеров. Поэтому полученная библиотека кДНК имеет соответствующие перспективы и значительный потенциал для использования в дальнейших геномных исследованиях не только этого злака, но и для улучшения характеристик других важных сельскохозяйственных растений.

cDNA LIBRARY CONSTRUCTION FROM PANICLE MERISTEM OF FINGER MILLET

V.V. Radchuk, Ya.V. Pirko,
S.V. Isayenkov, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany
Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv
E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

The protocol for production of full-size cDNA using SuperScript® Full-Length cDNA Library Construction Kit II (Invitrogen) was tested and high quality cDNA library from meristematic tissue of finger millet panicle (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn) was created. The titer of obtained cDNA library comprised $3,01 \cdot 10^5$ CFU/ml in average. In average the length of cDNA insertion consisted about 1070 base pairs, the effectivity of cDNA fragment insertions – 99,5 %. The selective sequencing of cDNA clones from created library was performed. The sequences of cDNA clones were identified with usage of BLAST-search. The results of cDNA library analysis and selective sequencing represents prove good functionality and full length character of inserted cDNA clones. Obtained cDNA library from meristematic tissue of finger millet panicle represents good and valuable source for isolation and identification of key genes regulating metabolism and meristematic development and for mining of new molecular markers to conduct out high quality genetic investigations and molecular breeding as well.

СТВОРЕННЯ БІБЛІОТЕКИ кДНК З МЕРИСТЕМАТИЧНОЇ ТКАНИНИ ВОЛОТІ ПАЛЬЧАТОГО ПРОСА

V.V. Radchuk, Ya.V. Pirko,
S.V. Isayenkov, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Апробовано протокол отримання повнорозмірної кДНК на основі набору SuperScript® Full-Length cDNA Library Construction Kit II («Invitrogen», США)

та створено бібліотеку кДНК з меристематичної тканини волоті пальчатого проса (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn). Середній титр отриманої бібліотеки кДНК склав $3,01 \cdot 10^5$ КУО/мл, середня довжина вставки кДНК – біля 1070 пар основ, середня ефективність вбудовування фрагментів кДНК – 99,5 %. Проведено вибіркове секвенування клонів створеної бібліотеки кДНК. Послідовності клонів кДНК ідентифіковані за допомогою BLAST пошуку. Результати аналізу бібліотеки кДНК і вибіркового секвенування свідчать про достатній рівень функціональності та повнорозмірності клонів кДНК. Створена бібліотека кДНК меристеми волоті пальчатого проса є надійним джерелом виділення та ідентифікації нових ключових генів метаболізму і розвитку меристеми, а також отримання нових генетичних маркерів для проведення генетичних досліджень та молекулярної селекції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ikeda T.M., Nagamine T., Fukuoka H., Yano H. Identification of new low-molecular-weight glutenin subunit genes in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2002. – **104**. – P. 680–687.
2. Clarke B.C., Laroque O.R., Bekes F. et al. The frequent classes of expressed genes in wheat endosperm tissue as possible sources of genetic markers // Austral. J. Bot. – 2002. – **53**. – P. 1181–1193.
3. Neves S. Eleusine // Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Millets and Grasses / Ed. C. Kole. – Berlin : Springer, 2011. – P. 113–133.
4. Varshney R.K., Ribaut J.-M., Buckler E.S. et al. Can genomics boost productivity of orphan crops? // Nature Biotechnol. – 2012. – **30**, № 12. – P. 1173–1176.
5. Chandrashekar A. Finger millet : *Eleusine coracana* // Adv. Food Nutr. Res. – 2010. – **59**. – P. 215–262.
6. Shobana S., Krishnaswamy K., Sudha V. et al. Finger millet (Ragi, *Eleusine coracana* L.): a review of its nutritional properties, processing, and plausible health benefits // Adv. Food Nutr. Res. – 2013. – **69**. – P. 1–39.
7. Циганков С.П., Володько О.І., Ємець А.І. та ін. Розроблення та випробування технології комплексного трансформування вуглеводного складу рослинної сировини у біоетанол // Наука та інновації. – 2013. – **9**, № 5. – С. 55–68.
8. Pradeep P., Reddy O.V.S., Mohan P.R., Ko S. Process optimization for ethanol production from very high gravity (VHG) finger millet medium using response surface methodology // Iran. J. Biotechnol. – 2012. – **10**, № 3. – P. 168–174.
9. Stadnichuk N.O., Abramov A.A. Finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.), variety «Tropikanka», Ukrainian plant variety certificate № 1252. State

- Service for Plant Variety Protection (invention № 9950001 from 12.12.1999), 2001.
10. Stadnichuk N.O., Bayer G.Ya., Yemets A.I. et al. Finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.), variety «Yaroslav-8», Ukrainian plant variety certificate № 09551. State Service for Plant Variety Protection (invention № 08324001 from 03.11.2008), 2009.
 11. Stadnichuk N.O., Yemets A.I., Rakhmetov D.B., Blume Ya.B. Finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.), variety «Yevgeniya», Ukrainian plant variety certificate № 120109. State Service for Plant Variety Protection (invention № 10344001 from 03.11.2010), 2011.
 12. Baer G.Ya., Yemets A.I., Stadnichuk N.A. et al. Somaclonal variability as a source for creation of new varieties of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) // Cytology and Genetics. – 2007. – **41**, № 4. – P. 204–208.
 13. Yemets A., Bayer G., Blume Y.B. An effective procedure for *in vitro* culture of *Eleusine coracana* (L.) and its application // ISRN Bot. – 2013. Article ID 853121, 7 p. doi: org/10.1155/2013/853121.
 14. Reddy I.N.B.L., Reddy D.S., Narasu L.M., Sivaramakrishnan S. Characterization of disease resistance gene homologues isolated from finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) // Mol. Breed. – 2011. – **27**. – P. 315–328.
 15. Radchuk V., Radchuk R., Pirko Y. et al. A somaclonal line SE7 of finger millet (*Eleusine coracana*) exhibits modified cytokinin homeostasis and increased grain yield // J. Exp. Bot. – 2012. – **63**. – P. 5497–5506.
 16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning : A laboratory manual. – New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 640 p.
 17. Bushman W., Thompson J.F., Vargas L., Landy A. Control of directionality in lambda site specific recombination // Science. – 1985. – **230**. – P. 906–911.
 18. Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination // Ann. Rev. Biochem. – 1989. – **58**. – P. 913–949.
 19. Ohara O., Temple G. Directional cDNA library construction assisted by the *in vitro* recombination reaction // Nucl. Acids Res. – 2001. – **29**. – e22.
 20. Takacs I., Koszegi D., Batrnabas B. cDNA library preparation from single wheat kernel // Acta Biol. Cracov. Bot. – 2008. – **50**. – P. 105–109.
 21. Asano T., Masumura T., Kusano H. et al. Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem // Plant J. – 2002. – **32**. – P. 401–408.

Поступила 13.02.14