

РАБОКОНЬ А. М.[✉], БЛОНОЖКО Ю. О., ПОСТОВОЙТОВА А. С., КАЛАФАТ Л. О., ПІРКО Я. В., БЛЮМ Я. Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

[✉] rabokonnastya@gmail.com

ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ γ -ТУБУЛІНУ У *ARABIDOPSIS THALIANA*

Мета. Верифікація можливості використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну у генетичних дослідженнях рослин на прикладі арабідопсису.

Методи. Використовували метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну. Ампліфіковані фрагменти ДНК фракціонували за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі. Смуги ДНК детектували шляхом фарбування нітратом срібла.

Результати. За допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну вперше було проаналізовано модельну рослину різущу Таля. Під час ампліфікації з виродженими праймерами у всіх зразків утворювались амплікони довжиною 520 п. н. та 555 п. н. За допомогою підібраних специфічних до арабідопсису праймерів до другого інтрону генів γ -тубуліну вдалося виокремити декілька зразків, які відрізняються за своїм ДНК-профілем. **Висновки.** Встановлено, що запропонований метод може бути застосований у молекулярно-генетичних дослідженнях рослин. При цьому розроблені специфічні праймери до інтронів генів γ -тубуліну, ймовірно, можуть бути використані як для дослідження арабідопсису, так і для споріднених видів рослин. Використання вироджених праймерів може стати у нагоді під час дослідження рослин, для яких відсутня інформація щодо структури їх геному.

Ключові слова: молекулярно-генетичні маркери, поліморфізм довжини інтронів, γ -тубулін, арабідопсис (*A. thaliana*).

На сьогодні ДНК-маркери є незамінним інструментом у сучасній генетиці та селекції рослин. Вони дозволяють проводити масштабні дослідження організації геномів, мінливості і стабільності, їх еволюційного розвитку тощо [1]. Саме тому пошук нових, більш ефективних і зручних маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу продовжує

бути надзвичайно актуальним. Досить новим підходом, який набуває все більшого практичного застосування, є оцінка поліморфізму довжини інтронів генів (Intron Length Polymorphism, ILP). Універсальність, відтворюваність та інформативність ILP-маркерів дозволяє проводити ДНК-профілювання та генотипування широкого спектра організмів [2–7]. Найбільш вдалим та надійним варіантом ILP-методу є оцінка поліморфізму довжини інтронів генів і β -тубуліну (Tubulin Based Polymorphism, TBP) та актину (Actin Based Polymorphism, ABP) [8–11]. Ці гени належать до «housekeeping» генів цитоскелетних білків, тому для їх білкових продуктів та, відповідно, екзонів характерна висока консервативність в усіх еукаріотичних організмів (на відміну від інтронів, які є гіперваріабельними ділянками та можуть мати різну довжину) [12, 13].

До основних структурних білків мікротрубочок також відноситься γ -тубулін, дуже необхідний для процесу нуклеації мікротрубочок [14]. Його амінокислотна послідовність є високонсервативною серед філогенетично різних організмів. Саме тому нами був запропонований метод, що ґрунтується на вивченні поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну [15], адже він має бути більш легким у використанні, тому що зазвичай γ -тубулін представлений у геномі двома паралогічними генами, що значно спрощує подальший аналіз отриманих результатів. Однак метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну ще потребує перевірки ефективності застосування для генотипування та диференціювання рослин. Для подальшого вирішення цього питання нами було використано модельний рослинний об'єкт – *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., геном якого повністю сиквененовано та анотовано. Тому метою роботи було провести верифікацію ефективності методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну для молекулярно-

© РАБОКОНЬ А. М., БЛОНОЖКО Ю. О., ПОСТОВОЙТОВА А. С., КАЛАФАТ Л. О., ПІРКО Я. В., БЛЮМ Я. Б.

генетичного аналізу рослин на прикладі арабідопсису.

Матеріали і методи

Експериментальним матеріалом слугували проростки *A. thaliana* дикого типу (Columbia). Геномну ДНК екстрагували за допомогою модифікованого ЦТАБ-методу [16]. Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» із визначенням концентрації та ступеня забруднення ДНК.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила п'ятикратний ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль $MgCl_2$, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного дНТФ, 0,5 од. Таq полімерази. Вироджені праймери для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну були запропоновані нами раніше [15]. Дизайн інших праймерів здійснювали за допомогою подвійного вирівнювання та програми PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Послідовності всіх праймерів наведені нижче у табл. 1.

Ампліфікацію проводили за таким протоколом: початкова денатурація (94 °C) - 5 хв; 35 циклів ампліфікації (94°C – 1 хв, 57-5 °C – 1 хв, 72°C – 2 хв); кінцеве подовження за 72°C протя-

гом 7 хв, утримання за 15°C. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1x TBE-буфері [17]. Візуалізацію фрагментів ДНК проводили шляхом фарбування нітратом срібла [18]. Після електрофорезу гель фотографували у видимому світлі. Аналіз зображень електрофоретичних гелів проводили в програмі GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких бендів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

Відомо, що в геномі *A. thaliana* наявні два гени γ -тубіліну (*U02069* та *U03990* (GenBank)). Було здійснено біоінформатичний аналіз екзон-інтронної структури цих анотованих послідовностей γ -тубуліну (табл. 2). На рис. 1 продемонстровано, що послідовності генів γ -тубуліну *A. thaliana* складаються з 10 консервативних екзонів та 9 варіабельних інтронів.

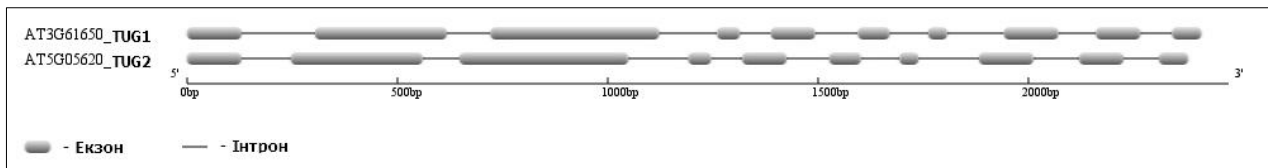
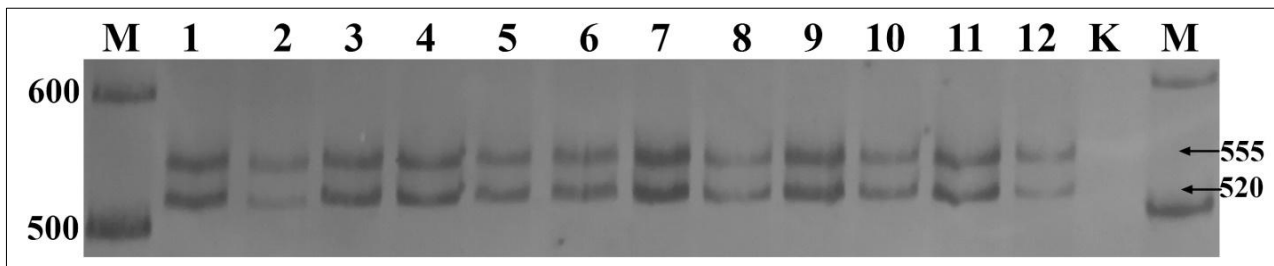
Результати проведеного електрофоретичного аналізу фрагментів ДНК, отриманих із використанням вироджених праймерів до інтронів генів γ -тубуліну, свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються амплікони довжиною приблизно 520 п. н. та 555 п. н. (рис. 2), що узгоджується з біоінформатичними даними.

Таблиця 1. Опис використаних праймерів

Назва праймерів	Праймери (5' - 3')		T, °C
	F	R	
TUG (вироджені)	GAYGTBTTYTTTTAC CARGCKGA	GAGTTGTARGGYTG GACRAC	59
TUG1+2_1int (до 1-го інтрону обох ізо- типів)	TTCTCGAG- GACTTCGCTACTC	CACATCTTTTCTAT- CACCTCCC	58
TUG1+2_2int (до 1-го інтрону обох ізо- типів)	CTTTGCCACTCTATT GCTGG	AGTCTCCAACAAT AAGATCCC	57
TUG1_2 int (специфічні до 2-го ін- троні зотипу-1)	TGGTTATCACCAGGG GAAGG	CTTCTTGCTGTAGCG ATCATTC	58
TUG2_2 int (специфічні до 2-го ін- троні зотипу-2)	GTGGATATCACCAA GGGAAAG	CCAACTTCTTGCTAT AACGATC	57

Таблиця 2. Хaрaктеристикa інтронів генів γ -тубуліну у *A. thaliana*

Назва гена γ -тубуліну	Довжина 1-го інтрону (п.н.)	Довжина 2-го інтрону (п.н.)	Довжина очікуваного продукту ПЛР, п. н./праймер
AT3G61650_TUG1	175	104	500-600/TUG 218/TUG1+2_1in 163/TUG1+2_2in 280/ TUG1_2in
AT5G05620_TUG2	118	88	500-600/TUG 161/TUG1+2_1in 147/ TUG1+2_2in 267/ TUG2_2in

Рис. 1. Екзон-інтронна структура 2 генів γ -тубуліну *A. thaliana*.Рис. 2. Молекулярні профілі *A. thaliana*, отримані за допомогою вироджених праймерів до інтронів генів γ -тубуліну: 1-12 – номери зразків; К – контроль, М – ДНК-маркер «100bp Ladder».

Оскільки під час використання вироджених праймерів не було виявлено відмінностей у більшості досліджених зразків, для більш глибокого аналізу поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну у *A. thaliana* було підбрано дві пари неспецифічних праймерів до першого та другого інтронів обох генів. У результаті аналізу за допомогою праймерів до першого інтрону генів γ -тубуліну виявлено, що у всіх зразках утворюються фрагменти ДНК довжиною 161 п. н. та 218 п. н. (рис. 3А). У ході застосування праймерів до другого інтрону генів γ -тубуліну було виявлено, що характерним є утворення фрагментів довжиною 147 п. н. та 163 п. н. (рис. 3Б). Однак у зразків № 1 та № 11 детектується лише один фрагмент ДНК (147 п. н.), який за результатами попереднього біоінформатичного аналізу відповідає продукту ампліфікації другого ізо типу γ -тубуліну з цим праймером. Можливо, у цих зразків дещо відрізняється послідовність гена TUG1, тому використані прай-

мери не відпалюються і, відповідно, не утворюється продукт реакції.

Надалі з метою більш детального вивчення зразків *A. thaliana*, можливого пояснення відсутності фрагмента у двох зразках та, найголовніше, відбору найбільш ефективних праймерів для диференціації зразків арабідопсису було використано дві пари специфічних праймерів до другого інтрону генів TUG1 та TUG2. Аналізували лише другий інтрон генів γ -тубуліну, адже під час підбору вироджених праймерів було встановлено, що саме фланкуючі його ділянки екзонів є найбільш консервативними серед різних рослин. Результати електрофоретичного аналізу фрагментів ДНК, які містять другий інтрон гена TUG1, свідчать про те, що в ході ПЛР утворюється фрагмент довжиною 280 п. н. (рис. 3 В). При цьому зразки №1 та №11 знову відрізняються від інших та мають фрагмент довжиною 278 п. н. Тому можна припустити, що у другому інтроні цих зразків наявна невелика делеція, яка і відрізняє їх від більшості досліджених зразків.

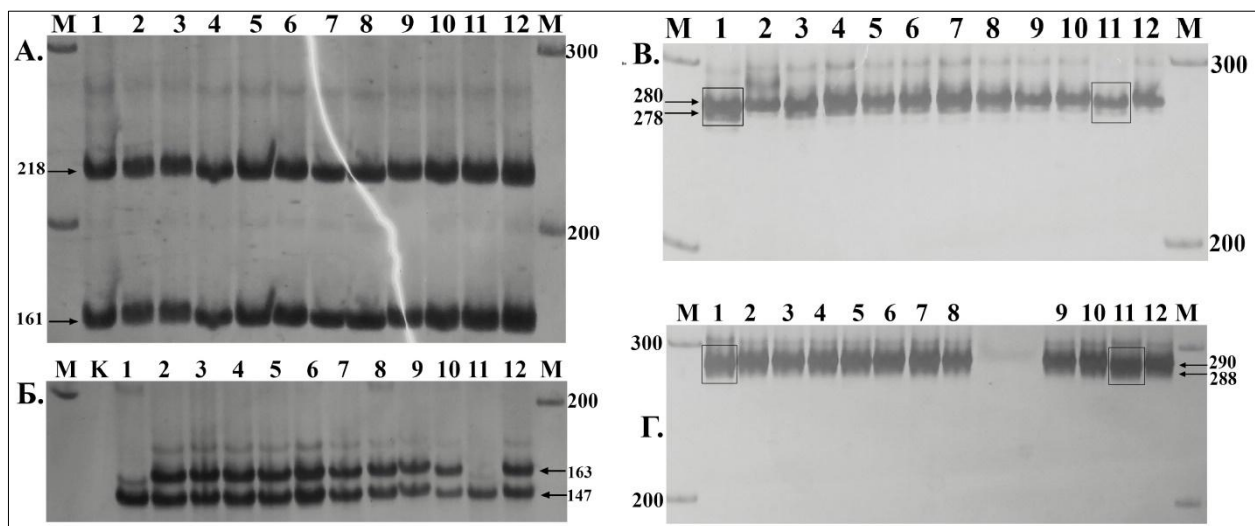


Рис. 3. Молекулярні профілі *A. thaliana*, отримані під час ПЛР із праймерами до першого інтрону обох генів γ -тубуліну (А), другого інтрону обох генів γ -тубуліну (Б), другого інтрону гена TUG1 (В) та до другого інтрону гена TUG2 (Г): 1–12 – номери зразків; К – контроль, М – ДНК-маркер «100bp Ladder». Прямокутником позначені поліморфні фрагменти ДНК.

За результатами електрофоретичного аналізу фрагментів ДНК, які містять другий інтрон гена TUG2, встановлено, що для більшості зразків характерним є наявність фрагмента довжиною 290 п. н. (рис. 3 Г). Довжина утвореного фрагмента ДНК відрізняється від біоінформатично передбаченої – 267 п. н. Однак це можна пояснити тим, що інтрони є гіперваріабельними ділянками і тому, напевно, відрізняються у сиквензованого (представленого в базах даних) та досліджуваних нами зразків. Важливо, що зразки №1 та №11 також відрізняються від інших та мають фрагмент довжиною приблизно 288 п. н.

Таким чином, у випадку *A. thaliana* більш інформативними виявилися специфічні праймери до інтронів генів γ -тубуліну. Однак вирожені праймери, ймовірно, можуть самостійно або в поєднанні з іншими генетичними маркерами використовуватися в молекулярно-генетичних дослідженнях інших видів рослин.

Висновки

Загалом у цьому дослідженні за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів ге-

нів γ -тубуліну вперше вдалося виявити певний поліморфізм довжини інтронів у досліджених зразків різущки Таля. Розроблена система може стати у нагоді в популяційній генетиці під час дослідження природних популяцій цього виду, адже про них є не так багато інформації, а такі дослідження розширюють уявлення про значення потоку генів в еволюції видів. Ймовірно, що розроблені специфічні праймери до інтронів генів γ -тубуліну можуть бути використані не лише для дослідження арабідопсису, а й споріднених видів родини Хрестоцвітих, адже гени γ -тубуліну є висококонсервативними. Використання вирожених праймерів може стати у нагоді за молекулярно-генетичних досліджень рослин, для яких відсутня інформація щодо структури їх геному.

Робота виконана за підтримки Національної академії наук України, в рамках гранта для молодих учених за науково-дослідною роботою «Впровадження методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну для молекулярно-генетичної диференціації рослин» (2019-2020 рр.).

References

1. Choi H.K., Luckow M.A., Doyle J., Cook D.R. Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *Mol. Genet. Genomics*. 2006. Vol. 276 (1). P. 56–70. doi: 10.1007/s00438-006-0118-8.
2. Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ. J. Genetics*. 2014. Vol. 4 (3). P. 2362–44. doi: 10.1134/S2079059714030022.
3. Pali V., Kumar S.V., Suchita X., Ravi R.S., Mehta N., Balkrishna S.V. Identification of microsatellite markers for fingerprinting popular Indian flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars and their utilization in seed genetic purity assessments. *Austral. J. Crop. Sci.* 2014. Vol. 8 (1). P. 119–126. doi: 10.15258/sst.2011.39.2.02.
4. Wang X., Zhao X., Zhu J., Wu W. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 2005. Vol. 12 (6). P. 417–427. doi: 10.1093/dnares/dsi019.

5. Zhao X., Yang L., Zheng Y. et al. Subspecies-specific intron length polymorphism markers reveal clear genetic differentiation in common wild rice (*Oryza rufipogon* L.) in relation to the domestication of cultivated rice (*O. sativa* L.). *J. Genet. Genomics*. 2009. Vol. 36 (7). P. 435–442. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60133-2.
6. Shu Y., Li Y., Zhu Y., Zhu Z. et al. Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean. *Theor. Appl. Genet.* 2010. Vol. 121 (1). P. 1–8. doi: 10.1007/s00122-010-1285-x.
7. He C., Liu H., Su S., Lu Y. et al. Genome wide identification of candidate phosphate starvation responsive genes and the development of intron length polymorphism markers in maize. *Plant Breed.* 2015. Vol. 134 (1). P. 11–16. doi: 10.1111/pbr.12230.
8. Bardini M., Lee D., Donini P. et al. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*. 2004. Vol. 47 (2). P. 281–291. doi: 10.1139/g03-132.
9. Rabokon A.N., Pirko Y.V., Demkovych A.Y., Blume Y.B. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52 (1). P. 3–15. doi: 10.3103/S0095452718010115.
10. Rabokon A., Demkovich A., Sozinov A., Kozub N., Pirko Ya., Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. *Cell Biol. Int.* 2019. Vol. 43. P. 1031–1039. doi: 10.1002/cbin.10886.
11. Postovoitova A.S., Yotka O.Y., Pirko Y.V., Blume Y.B. Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52 (6). P. 448–460. doi: 10.3103/S0095452718060099.
12. Breviario D. Plant tubulin genes: regulatory and evolutionary aspects. In: Plant Microtubules. *Plant Cell Monogr.* (Ed. P. Nick). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. P. 207–232. doi: 10.1007/7089_2007_160.
13. Morello L., Breviario D. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr. Genomics*. 2008. Vol. 9. P. 227–238. doi: 10.2174/138920208784533629.
14. Farache D., Emorine L., Haren L., Merdes A. Assembly and regulation of γ -tubulin complexes. *Open Biol.* 2018. Vol. 8 (3). P. 170266. doi: 10.1098/rsob.170266.
15. Pirko Ya.V., Buy D.D., Postovoitova A.S., Rabokon A.M., Kalafat L.O., Blume Ya.B. New ILP method based on γ -tubulin genes intron length polymorphism. *Reports Natl. Acad. Sci. Ukraine*. 2018. № 12. P. 1025–1030. [in Ukrainian] / Пірко Я.В., Буй Д.Д., Пoстoвoйтoвa А.С. та інш. Поліморфізм довжини інтронів генів γ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин. *Дoпoв. Нaц. aкaд. нaук Укp.* 2018. № 12. С. 1025–1030. doi: 10.15407/dopovidi2018.12.087.
16. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bulletin*. 1987. Vol. 19. P. 11–15.
17. Sambrook J., David W.R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 2.
18. Benbouza H., Jacquemin J-M., Baudoin J-P., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. Vol. 10 (2). P. 77–81.

RABOKON A.M., BILONOZHKO Yu.O., POSTOVOITOVA A.S., KALAFAT L.O., PIRKO Ya.V., BLUME Ya.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskoho str., 2A, e-mail: rabokonnastya@gmail.com

γ -TUBULIN GENE INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

Aims. Verification of the possibility of using the γ -tubulin gene intron length polymorphism method in genetic studies of plants on the example of *Arabidopsis thaliana*. **Methods.** The γ -tubulin gene intron length polymorphism evaluating method was used. Amplified fragments DNA were fractionated by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel. DNA bands were detected using silver nitrate staining. **Results.** Arabidopsis was first time analyzed using the γ -tubulin gene intron length polymorphism method. During amplification with degenerate primers 2 amplicons (520 bp and 555 bp) were formed in all samples. However, using selected arabidopsis-specific primers for the second intron of the γ -tubulin genes, it was possible to find several samples that differ in their DNA profile. **Conclusions.** It is established that the proposed method can be used in molecular genetic studies of plants. Moreover, the developed specific primers for γ -tubulin gene introns can probably be used both for the study of Arabidopsis and related species. The use of degenerate primers can be useful in the study of plants for which there is no information about their genome.

Keywords: molecular-genetic markers, intron length polymorphism, γ -tubulin, *A. thaliana*.