

О.В. Марковський¹, М.О. Банникова¹, В.В. Борисова², Т.В. Федоренко¹, Б.В. Моргун¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

² Інститут сільського господарства степової зони НААН України, Дніпропетровськ

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНІВ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ ЯКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕРНА ТА СТІЙКІСТЬ ДО СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ, У КУКУРУДЗИ



Здійснено оцінку 200 експериментальних форм кукурудзи НВФГ «Компанія "Маїс"» щодо наявності генів, які детермінують якісні характеристики зерна (гени *wx* та *fl-2*) та стійкість до гербіцидів (гени *bar (pat)*, *epsps*) і комах (*cry*-гени). Проведено виділення загальної ДНК з живої рослинної тканини кукурудзи, добір та дизайн праймерів для виявлення генів *wx*, *fl-2*, *bar (pat)*, *terpsps*, *CP4 epsps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *tcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*. Розроблено методики мультиплексної та низхідної (*Touchdown*) полімеразних ланцюгових реакцій (ПЛР) та проведено ампліфікацію визначених послідовностей. Серед проаналізованих 200 експериментальних форм кукурудзи НВФГ «Компанія «Маїс» жодного трансгена (*bar (pat)*, *terpsps*, *CP4 epsps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *tcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*) виявлено не було, у той час як ген *fl-2* знайдено у 41-му зразку, ген *wx* — у 192-х проаналізованих зразках.

Ключові слова: кукурудза, трансгени, якісні характеристики зерна, праймери, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Кукурудза — одна з найпоширеніших зернових, фуражних і силосних культур у світі. В Україні кукурудза займає все більше посівних площ. Так, згідно з даними Держстату України, посівні площі під кукурудзу в 2012 р. були збільшені до 4,7 млн. га.

У світі трансгенна кукурудза завдяки своїй стійкості до комах шкідників і толерантності до гербіцидів займає більше 50 % посівних площ, відведених під цю культуру. Навіть у країнах ЄС зареєстровано та дозволено до використання 12 основних трансформаційних подій кукурудзи (*Bt11*, *Bt176*, *DAS1507*, *GA21*, *MON810*, *MON863*, *NK603*, *T25*, *DAS59122*, *MON89034*, *MON88017*, *MIR604*) та їх поєднань [1] згідно з Постановою ЄС 1829/2003.

За оцінками різних джерел 5–10 % рослин кукурудзи, культивованої в Україні, містять трансгени або трансформаційні події. До 2007 р. в Україні не було створено своїх трансгенних ліній (гібридів) кукурудзи. Здебільшого трансгенна кукурудза в Україні містить трансформаційні події, створені компаніями Bayer, Monsanto, Syngenta, Pioneer, Dow AgroSciences.

У 2007 р. в Україні був прийнятий закон «Про державну систему безпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» [2]. Виробники сільськогосподарських рослин, зокрема кукурудзи, повинні або вилучати її з сівобігу, або маркувати трансгенну продукцію.

Перед нами стояло завдання провести оцінку експериментальних форм кукурудзи науково-виробничого фермерського господарства «Компанія "Маїс"» для виявлення трансгенів. Генетично модифікованої кукурудзи, яка міс-

тять окремі трансгени, практично не існує. Всі трансгени входять до складу трансформаційних подій — комплексних трансформантів, які характеризуються унікальним поєднанням елементів генетичної конструкції і геномної ДНК рослини з однозначним місцем вбудовування. Таким чином, потрібно було розробити методи, які дозволяли б детектувати трансформаційні події кукурудзи, до складу яких входять гени стійкості до стресових факторів. Одночасно з метою ефективного відбору форм кукурудзи для подальшого залучення у селекційний процес нами були виявлені гени, які детермінують якісні характеристики зерна.

ТРАНСГЕНИ, ЯКІ ЗУМОВЛЮЮТЬ СТІЙКІСТЬ ДО СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

Гени *bar (pat)*, *CP4 epsps*, *mepps* високоєфективні і широко застосовуються у світовій практиці для створення трансгенних рослин, стійких до гербіцидів суцільної дії, до яких продукти цих генів надають гарантовану стійкість. Гени *bar (pat)* кодують стійкість до гербіцидів на основі фосфінотрицину (PPT) — Basta, Glufosinate, Phosphinothricin. Гени *CP4 epsps*, *mepps* кодують фермент 5-енолпірувілшікімат-3-фосфат синтазу (EPSPS), не чутливий до згубної дії гліфосату (гербіцид Roundup).

Гени *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* надають стійкість рослинам до комах-шкідників, зокрема гени *cry1A(b)*, *cry1F* протистоять європейському буряльщику кукурудзи (*Ostrinia nubilalis*), гени *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry3Bb1*; *mcry3A* — західному кукурудзяному жуку (*Coleoptera, Diabrotica* spp.), а *cry2Ab2* — комахам-шкідникам класу *Lepidoptera*.

Гени, стійкості до гербіцидів та комах-шкідників, входять до складу трансформаційних подій. Ген *cry1A(b)* входить до складу трансформаційних подій Bt11, Bt176, MON810, ген *cry1F* — до трансформаційної події DAS1507, гени *cry34Ab1*, *cry35Ab1* — до DAS59122, ген *cry3Bb1* — до MON863 та MON88017, ген *mcry3A* — до MIR604, гени *cry1A.105* та *cry2Ab2* — до MON89034.

Гени *bar (pat)* входять до складу трансформаційних подій Bt11, Bt176, DAS1507, DAS59122 та T25, гени *mepps*, *CP4 epsps* — до GA21, MON88017 та NK603.

ГЕНИ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ ЯКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕРНА

Другим напрямком нашої роботи був молекулярно-генетичний пошук експериментальних форм кукурудзи НВФГ «Компанія "Маїс"», котрі містять генетичні послідовності, які детермінують якісні характеристики зерна: ген *wx*, що відповідає за крохмалистість ендосперму зерна, та ген *fl-2*, що відповідає за збільшений вміст лізину та метіоніну у зерні.

Фенотип кукурудзи *floury 2* формує ендосперм зі зменшеною кількістю проламінових білків. Ці білки кодуються групою генів *zein* і багаті на глутамін та пролін, але бідні на лізин та триптофан. Їх кількість сягає 60–70 % від загальних білків насінини, тому спостерігається незбалансований амінокислотний склад ендосперму, що знижує поживну цінність зерна. Мутація *fl-2* викликає порушення синтезу α -, β -, γ -*zein* білків, внаслідок чого формується м'який рихлий ендосперм та збільшується/врівноважується кількість лізин- та триптофанвмісних білків у зерні. Тому ця мутація високо цінується селекціонерами.

Кукурудза *Waxy* (воскова) має низький вміст амілози (<5 %) у крохмалі зерна і несе нульову мутацію гена *wx*. Цей локус кодує фермент грануло-асоційовану-крохмаль-синтазу-1, яка каталізує елонгацію молекул амілози. Рецесивна алель гена *wx* інгібує активність цього ферменту, а тому зменшує вміст амілози у крохмалі ендосперму. У зерні накопичується лише амілопектин. Амілопектин краще перетравлюється амілазами, ніж амілоза, а тому це — більш технологічна сировина у промисловості. В даний час ведеться селекційний добір на ознаку восковидності.

Виявлення генетичних послідовностей, які детермінують якісні характеристики зерна, пов'язане з необхідністю відбору ліній кукуруд-

зи, котрі будуть залучатися у подальший селекційний процес, спрямований на підвищення якості зерна. Зерно кукурудзи, яке містить ген крохмалистості (*wx*), більш придатне при виробництві біоетанолу, а зерно зі збільшеним вмістом лізину та метіоніну (*fl-2*) переважає при виробництві продуктів харчування.

ПРОТОКОЛ ДЕТЕКЦІЇ ТРАНСГЕНІВ ТА ГЕНІВ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ ЯКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕРНА КУКУРУДЗИ

У роботі досліджували 200 експериментальних селекційних зразків насіння кукурудзи. Методика виявлення чужорідних генів відпрацьовувалася на референтних зразках кукурудзи, які містять відповідні трансформаційні події.

Для отримання очищених препаратів загальної ДНК насіння пророщували. Свіжу тканину перетирали у керамічних ступках з ЦТАБ (20 г/л ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 0,1 М Tris-HCl, 20 мМ Na₂EDTA, рН 8,0) і 1,4-меркаптоетанолом. Проводили обробку РНКазою А та очищали хлороформом від білків. Загальну ДНК висолювали етиловим спиртом і промивали. Осад розчиняли у ТЕ-буфері рН 8,0 [3, 4]. Для перевірки наявності та якості виділення загальної рослинної ДНК застосовували розділення нуклеїнових кислот шляхом електрофорезу в агарозному гелі [4]. Далі проводили спектрофотометричне вимірювання концентрації нуклеїнових кислот. Чистоту загальної ДНК визначали співвідношенням поглинань при довжинах хвиль 230, 260, 280, 320 нм. Концентрацію ДНК зразків стандартизували до 30 нг/мкл.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за Аусубелем [4]. Умови для стадії відпаду розраховували згідно з властивостями олігонуклеотидних праймерів. Концентрації праймерів підбирали емпірично у кожному випадку індивідуально залежно від специфічності зв'язування з матрицею ДНК. При появі великої кількості неспецифічних продуктів ампліфікації або занадто великої різниці температур плавлення різних пар праймерів, які використовувалися в одній ре-

акційній суміші, розробляли методику низхідної (Touchdown) ПЛР.

Електрофорез 12 мкл продуктів ампліфікації кожного зразка після ПЛР проводили в агарозному гелі (1,2 %). За молекулярну лінійку брали 400 нг маркера молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Умови проведення електрофорезу для всіх зразків були такими: напруга — 5 В/см, тривалість — 1–1,5 години. Для візуалізації фрагментів ДНК (ампліконів) у трис-боратний буфер (ТВЕ) додавали 5 мкг/л бромистого етидію, гель фотографували GelDoc™ (BioRad) і обробляли за допомогою графічного редактора GIMP.

АНАЛІЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ФОРМ КУКУРУДЗИ НА НАЯВНІСТЬ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

До складу кожної трансформаційної події входить 2–3 трансгена. Для їх виявлення було проведено добір та дизайн специфічних праймерів конкретно для кожного гена чи трансформаційної події (табл. 1, 2) [5–14]. Тому були розроблені мультіплексні ПЛР (мПЛР), які дозволяють в одній реакції проводити ампліфікацію декількох досліджуваних ділянок ДНК характерної довжини [15]. Це сприяє зменшенню часу реакції, витрат реактивів та навантаження на прилад.

Для детекції трансгенів чи трансформаційних подій готували реакційні суміші об'ємом 20 мкл. До їх складу входили 1×DreamTaq™ Green буфер, 0,5 одиниці DreamTaq™ полімерази (Thermo Scientific), 200 мкМ дНТФ, 30 нг зразка рослинної ДНК, праймери до референтного гена *zein* і праймери до досліджуваної трансформаційної події/трансгенів у відповідних концентраціях згідно з даними, наведеними в табл. 1.

У всіх випадках як негативний контроль використовували реакційну суміш з 1 мкл ТЕ буфера рН 8,0 замість зразка ДНК.

Програма мПЛР на наявність трансформаційних подій VT176, MON810, MON88017,

Перелік праймерів до трансформаційних подій, температур їх плавлення та температур відпалу при проведенні ПЛР

| Трансформаційна подія (гени) | Праймер | Концентрація праймерів у реакційній суміші для ПЛР, мкМ | Температура плавлення, °С | Температура відпалу, °С |
|---|--------------|---|---------------------------|-------------------------|
| Референтний ген <i>adh1</i> | Adh-F3 | 0,20 | 66 | 55 |
| | Adh-R1 | 0,20 | 60 | |
| Референтний ген <i>zein</i> | Zein3 | 0,30 | 57 | 50 |
| | Zein4 | 0,30 | 55 | |
| Bt11 (<i>cry1A(b)</i> , <i>pat</i>) | IVS2-2 | 0,35 | 62 | 57 |
| | PAT-B | 0,35 | 64 | |
| | Bt11-1 | 0,45 | 57 | 51 |
| | Bt11-2 | 0,45 | 56 | |
| Bt176 (<i>cry1A(b)</i> /int.9 PEPC, <i>pat</i>) | PEPC-C-20 | 0,35 | 63 | 56 |
| | CRYIA4 | 0,35 | 61 | |
| MON810 (<i>cryIA(b)</i> з інтроном int.hsp70) | mg1 | 0,45 | 66 | 59 |
| | mg2 | 0,45 | 64 | |
| | VM01 | 0,35 | 65 | 59 |
| | VM03 | 0,35 | 64 | |
| DAS1507 (<i>cry1F</i> , <i>pat</i>) | TC1507 01-5 | 0,50 | 61 | 56 |
| | TC1507 01-3 | 0,50 | 61 | |
| | TC1507-1F | 0,50 | 58 | 59 |
| | TC1507-2R | 0,50 | 57 | |
| MON89034 (<i>cry1A.105</i> , <i>cry2Ab2</i>) | M8F2 | 0,25 | 65 | 60 |
| | M8R2 | 0,25 | 65 | |
| DAS59122 (<i>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i> , <i>pat</i>) | 59F1 | 0,45 | 67 | 60 |
| | 59R1 | 0,45 | 65 | |
| | SEQ ID NO 9 | 0,45 | 69 | 57 |
| | SEQ ID NO 10 | 0,45 | 63 | |
| MON863 (<i>cry3Bb1</i> , <i>nptII</i>) | P863-3F | 0,35 | 55 | 50 |
| | P863-4R | 0,35 | 56 | |
| | 84_18-L | 0,35 | 57 | 49 |
| | 84_18-R | 0,35 | 54 | |
| MON88017 (<i>cry3Bb1</i> , CP4 <i>epsps</i>) | M7F8 | 0,45 | 67 | 60 |
| | M7R8 | 0,45 | 65 | |
| | MON88017-mF | 0,45 | 58 | 53 |
| | MON88017-mR | 0,45 | 61 | |
| MIR604 (<i>mcry3A</i> , <i>pmi</i>) | M6F1 01-5 | 0,35 | 67 | 62 |
| | M6R1 01-3 | 0,35 | 67 | |
| | E-604-F | 0,50 | 60 | 55 |
| | E-604-R | 0,50 | 65 | |
| GA21 (<i>mepsps</i>) | esGA21-5 'F | 0,45 | 63 | 52 |
| | esGA21-5' R | 0,45 | 57 | |
| NK603 (CP4 <i>epsps</i>) | NK603F | 0,45 | 64 | 59 |
| | NK603R | 0,45 | 66 | |
| | SEQ ID NO 13 | 0,45 | 60 | 52 |
| | SEQ ID NO 14 | 0,45 | 57 | |
| T25 (<i>bar/pat</i>) | T25-F7 | 0,45 | 59 | 54 |
| | T25-R3 | 0,45 | 63 | |

Нуклеотидні послідовності праймерів до трансформаційних подій

| Трансформаційна подія | Назва праймера | Нуклеотидна послідовність праймера | Розмір амплікону, п.о. | Специфічність |
|-----------------------------|----------------|---|------------------------|--------------------------|
| Референтний ген <i>adh1</i> | Adh-F3 | 5'-CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC-3' [5] | 231 | До гена <i>adh1</i> |
| | Adh-R1 | 5'-GACAGAGGAGAAACAAGGCG-3' [5] | | |
| Референтний ген <i>zein</i> | Zein3 | 5'-AGTGCAGCCCATATTCCAG-3' [5] | 277 | До гена <i>zein</i> |
| | Zein4 | 5'-GACATTGTGGCATCATCATTT-3' [5] | | |
| Bt176 | CRY04 | 5'-GGTCAGGCTCAGGCTGATGT-3' [6] | 186 | До К |
| | PEPC-C-20 | 5'-ATCTCGCTTCCGTGCTTAGC-3' [7] | | |
| MON810 | mg1 | 5'-TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC-3' [7] | 401 | До К |
| | mg2 | 5'-TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT-3' [7] | | |
| | VM01 | 5'-TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG-3' [8] | | |
| MON88017 | VM03 | 5'-TCCATCTTTGGGACCACTGTGC-3' [8] | 313 | До гена <i>cry3Bb1</i> |
| | M7F8 | 5'-CGCCAAGTCCAAGGCCCTGG-3' [8] | | |
| | M7R8 | 5'-CGCCAAGTCCAAGGCCCTGG-3' [8] | | |
| | MON88017-mF | 5'-ATCGTGTGACAACGCTAGCA-3' [9] | | |
| | MON88017-mR | 5'-CATATTGACCATCATACTCATTTGCT-3' [9] | | |
| DAS1507 | TC1507 01-5 | 5'-GCTTCAACAGGGCTGAGTTTG-3' [7] | 103 | До К |
| | TC1507 01-3 | 5'-CCCCACACAGTTTGGGATCTA-3' [7] | | |
| | TC1507-1F | 5'-CTTGTGGTGTGTTGTGGCTCT-3' [7] | | |
| DAS59122 | TC1507-2R | 5'-TGGCTCCTCCTTCGTATGT-3' [7] | 279 | До ТП |
| | 59F1 | 5'-GCACCTCCCCGACCAACGTG-3' [7] | | |
| | 59R1 | 5'-CCGGCGAACGGGTTGTGCGAA-3' [7] | | |
| MIR604 | SEQ ID NO 9 | 5'-CTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAG-3' [10] | 313 | До К |
| | SEQ ID NO 10 | 5'-TTTTGCAAAGCGAACGATTCAGATG-3' [10] | | |
| | M6F1 | 5'-CGCCATCAGCGGCTACGAGG-3' [7] | | |
| | M6R1 | 5'-GGTCATCTCGCGCGGTAGC-3' [7] | | |
| | E-604-F | 5'-TGGACGCCAGATCACACATG-3' [7] | | |
| GA21 | E-604-R | 5'-GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3' [7] | 101 | До ТП |
| | esGA21-5' F | 5'-CGTTATGCTATTTGCAACTTTAGAACA-3' [11] | | |
| NK603 | esGA21-5' R | 5'-GCGATCCTCCTCGCGTT-3' [11] | 108 | До ТП |
| | NK603F | 5'-ATGAATGACCTCGAGTAAAGCTTGTTAA-3' [12] | | |
| | NK603R | 5'-AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT-3' [12] | | |
| Bt11 | SEQ ID NO 13 | 5'-AATCGATCCAAAATCGCGACTG-3' [9] | 501 | До ТП |
| | SEQ ID NO 14 | 5'-TTCACTTTGGGCCACCTTTAT-3' [9] | | |
| | Bt11-1 | 5'-TATCATCGACTTCCATGACCA-3' [7] | | |
| MON863 | Bt11-2 | 5'-AGCCAGTTACCTTCGGAAAA-3' [7] | 207 | До ТП |
| | IVS2-2 | 5'-CTGGGAGGCCAAGGTATCTAAT-3' [13] | | |
| | PAT-B | 5'-GCTGCTGTAGCTGGCCTAATCT-3' [13] | | |
| | P863-3F | 5'-GGCGATGAATAAATGAGAAATA-3' [9] | | |
| | P863-4R | 5'-TAGCCAGTTCATTGCGAGTA-3' [9] | | |
| MON89034 | 84_18-L | 5'-GATGACCTGACCTACCAGA-3' [7] | 234 | До К |
| | 84_18-R | 5'-GCACACACATCAACCAAATT-3' [7] | | |
| | M8F2 | 5'-TTGGGGTGAAGCACCGGGA-3' [7] | | |
| T25 | M8R2 | 5'-GCACACGTTTGTCTGCGGCG-3' [7] | 713 | До гена <i>cry1A.105</i> |
| | T25-F7 | 5'-ATGGTGGATGGCATGATGTTG-3' [14] | | |
| | T25-R3 | 5'-TGAGCGAAACCCTATAAGAACC-3' [14] | | |

Примітка: ТП — трансформаційна подія; К — генетична конструкція.

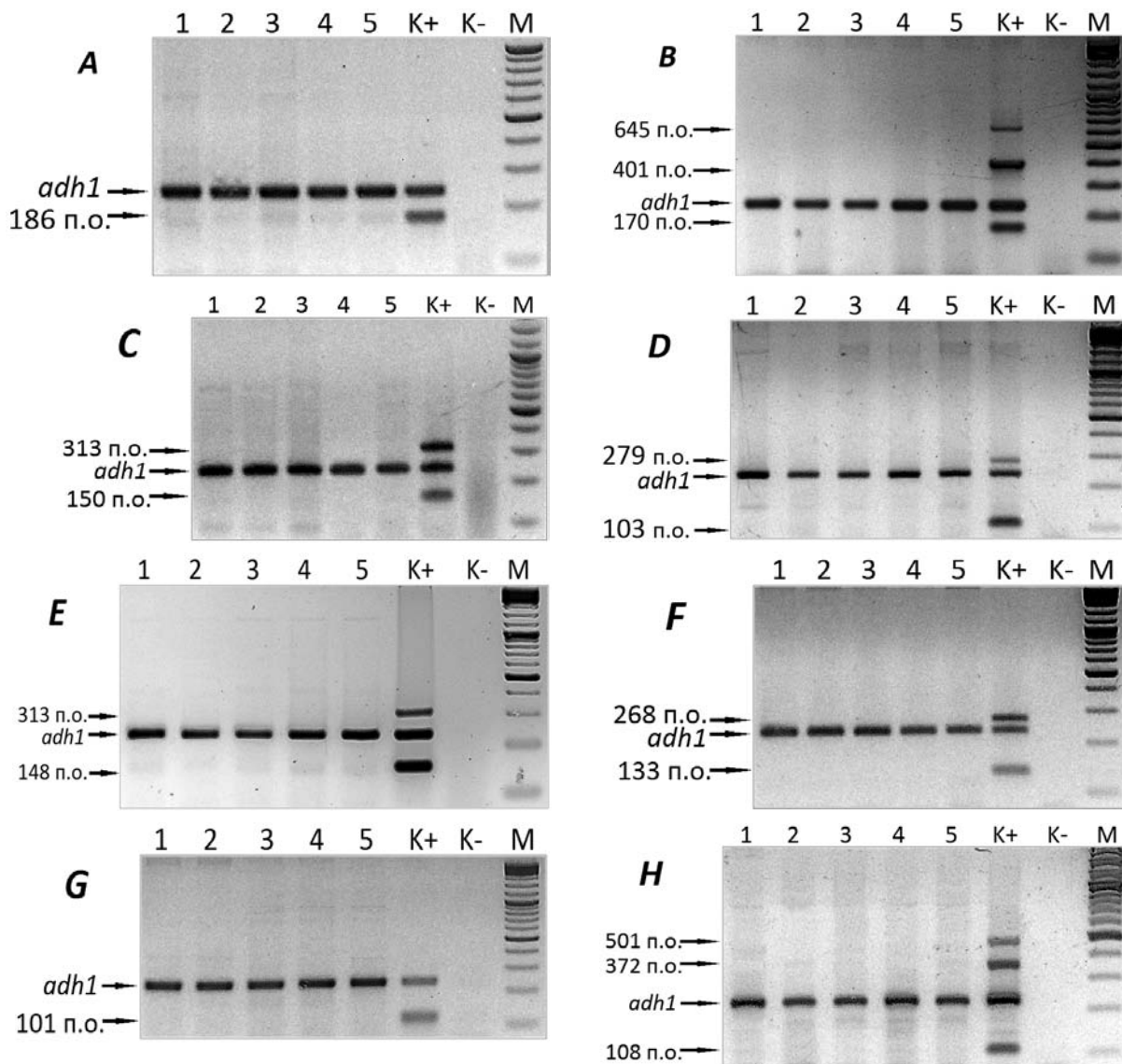


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ампліфікацій мультиплексних ПЛР на виявлення трансформаційних подій: доріжки 1–5 – досліджувані зразки; K+ – позитивний контроль (референтний зразок); K– – негативний контроль; TE – буфер замість зразка ДНК; M – маркер молекулярної маси O’GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Амплікон *adh1* (231 п.о.) референтний для усіх реакцій

DAS1507, MIR604, DAS59122, GA21, NK603 була такою: денатурація рослинної ДНК – 4 хв при 94 °С; проводили 35 циклів, кожен з яких включав денатурацію ДНК – 30 с при 94 °С. Температуру ренатурації ДНК з олігонуклеотидними праймерами і час синтезу фрагментів цільових генів для кожної трансформаційної

події підбирали індивідуально (табл. 3). Час ренатурації ДНК – 30 с, температура синтезу фрагментів цільових генів – 72 °С. Заключний синтез у всіх реакціях був 10 хв при 72 °С.

Продукти мПЛР представляли собою фрагменти референтного гена кукурудзи *adh1* розміром 231 пар основ (п.о.) і цільові фрагменти

ДНК генів/трансформаційних подій/генетичних конструкцій, які мають характерну довжину (див. табл. 2, рис. 1).

A. BT176. Фрагмент ДНК розміром 186 п.о. складається з частини РЕРС-промотору та частини гена *cry1A(b)* генетичної конструкції.

B. MON810. Фрагмент ДНК розміром 170 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції; фрагмент ДНК генетичної конструкції розміром 401 п.о.; фрагмент довжиною 645 п.о., утворений в результаті синтезу ділянки, яка обмежена праймерами з різних пар (VM01 і mg2), що додатково свідчить про наявність трансформаційної події MON810 у зразку ДНК.

C. MON88017. Фрагмент ДНК розміром 150 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції; фрагмент кодує послідовності гена *cry3Bb1* розміром 313 п.о.

D. DAS1507. Фрагмент ДНК розміром 279 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції; фрагмент ДНК генетичної конструкції розміром 103 п.о.

E. DAS59122. Фрагмент ДНК розміром 148 п.о. складається з частини гена *cry34Ab1*; фрагмент ДНК розміром 313 п.о. складається з 5'-фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції.

F. MIR604. Фрагмент ДНК розміром 133 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції;

фрагмент гена *cry3A* генетичної конструкції розміром 268 п.о.

G. GA21. Фрагмент ДНК розміром 101 п.о. складається з ділянки рослинної ДНК і ділянки актинового промотора рису генетичної конструкції.

H. NK603. Фрагмент ДНК розміром 501 п.о. складається з 5'-фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції; фрагмент ДНК розміром 108 п.о. складається з 3'-фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції; фрагмент розміром 372 п.о. утворений в результаті синтезу ділянки, яка обмежена праймерами з різних пар (SEQ ID NO 13 і NK603F), що додатково свідчить про наявність трансформаційної події NK603 у зразку ДНК.

На рис. 1 видно, що для референтних зразків отримані амплікони відповідають очікуваним, наведеним у табл. 2. У досліджуваних зразках експериментальних форм кукурудзи спостерігається тільки референтний ген кукурудзи *adh1*, що свідчить про наявність та якість рослинної ДНК у досліджуваних зразках і відсутність трансгенів чи трансформаційних подій у генетичному матеріалі рослин. У референтних зразках спостерігаються як маркерний ген кукурудзи *adh1*, так і амплікони очікуваних розмірів, що свідчить про адекватність підібраних умов мПЛР і наявність трансформаційних подій. Негативні контролю не містять ніяких фрагментів, що у свою чергу свідчить про відсутність забруднень реактивів ДНК і належну якість проведення реакції.

Таблиця 3

Температура ренатурації ДНК з олігонуклеотидними праймерами і час синтезу фрагментів цільових генів при мПЛР

| Трансформаційна подія | Температура ренатурації ДНК, °С | Час синтезу фрагментів цільових генів, с | Трансформаційна подія | Температура ренатурації ДНК, °С | Час синтезу фрагментів цільових генів, с |
|-----------------------|---------------------------------|--|-----------------------|---------------------------------|--|
| BT176 | 55 | 18 | DAS59122 | 59 | 22 |
| MON810 | 58 | 27 | MIR604 | 58 | 19 |
| MON88017 | 55 | 22 | GA21 | 56 | 17 |
| DAS1507 | 55 | 20 | NK603 | 56 | 33 |

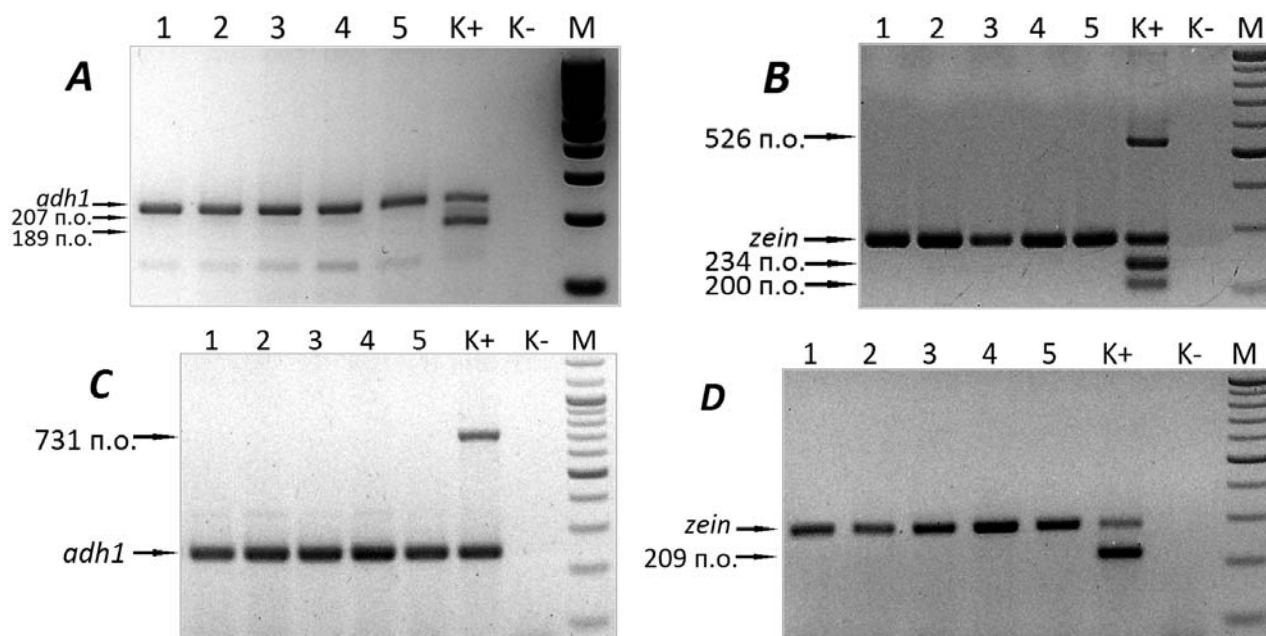


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікацій низхідних ПЛР на виявлення трансформаційних подій: доріжки 1–5 – досліджувані зразки; K+ – позитивний контроль (референтний зразок); K- – негативний контроль – ТЕ буфер замість зразка ДНК; M – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Амплікони генів *adh1* (231 п.о.) та *zein* (277 п.о.) референтні

У деяких випадках розроблена методика виявлення трансформаційних подій за допомогою мПЛР не давала чітких і достовірних результатів, тому додатково була розроблена методика низхідної ПЛР (для трансформаційних подій Bt11, MON863, MON89034 і T25 і трансгенів, які входять до їх складу). Відмінність методики проведення низхідної ПЛР полягає в тому, що використовується початкова температура відпалу на 15 °С вища прогнозованої температури плавлення праймерів. Протягом 15 послідовних циклів температура відпалу поступово знижується на 1 °С до оптимальної для даної пари праймерів. Подальший 21 цикл проходить при оптимальній температурі, забезпечуючи експоненціальне збільшення кількості тільки цільового амплікону. Початкове збільшення температури відпалу гарантує лише специфічне зв'язування праймерів з матрицею ДНК, причому спостерігається майже повна відсутність синтезу неспецифічних фрагментів. Через широкий спектр використовуван-

них температур низхідна ПЛР може забезпечити оптимальне проходження реакції навіть для матриць, важких для ампліфікації [16].

При детекції більшості трансгенів чи трансформаційних подій як референтний ген використовувався *adh1*. Амплікони подій MON863 і T25 мають розміри 234 п.о. і 209 п.о. відповідно, тобто вони подібні за розміром до амплікону *adh1* (231 п.о.), що ускладнює їх розділення і ідентифікацію методом гель-електрофорезу. У зв'язку з цим було прийнято рішення використовувати ген *zein* (277 п.о.) як референтний (див. табл. 2).

Програма низхідної ПЛР на наявність трансформаційних подій Bt11, MON863, MON89034, T25 була такою: денатурація рослинної ДНК – 4 хв при 94 °С; проводили 15 циклів, кожен з яких включав денатурацію ДНК – 30 с при 94 °С. Температуру ренатурації ДНК з олігонуклеотидними праймерами і час синтезу фрагментів цільових генів для кожної трансформаційної події підбирали індивідуально (табл. 4).

Далі проводили 21 цикл, кожен з них включав денатурацію ДНК — 30 с при 94 °С. Температуру ренатурації ДНК з олігонуклеотидними праймерами і час синтезу фрагментів цільових генів для кожної трансформаційної події підбирали індивідуально. Час ренатурації рослинної ДНК з олігонуклеотидними праймерами, характерний для обох етапів, — 30 с, температура синтезу фрагментів цільових генів — 72 °С. Заключний синтез становив 10 хв при 72 °С.

Продукти низхідної ПЛР представляли собою фрагменти референтного гена кукурудзи *adh1* розміром 231 п.о. або референтного гена *zein* розміром 277 п.о. і цільові фрагменти ДНК генів/трансформаційних подій/генетичних конструкцій, що мають характерну довжину (табл. 2, рис. 2).

А. ВТ11. Фрагмент ДНК розміром 189 п.о. складається з частини *adh1*-енхансера і ділянки *pat* гена у генетичній конструкції, якою проводили трансформацію; фрагмент ДНК розміром 207 п.о. складається з 5'-фланкуючої ділянки рослинної ДНК і ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводили трансформацію.

В. МОН863. Фрагмент ДНК розміром 200 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК генетичної конструкції; фрагмент ДНК генетичної конструкції розміром 234 п.о.; фрагмент довжиною 526 п.о. утворився в результаті синтезу ділянки, обмеженої праймерами з різних пар (84_18-L і P863-4R), що додатково

свідчить про наявність трансформаційної події МОН863 у зразку виділеної ДНК.

С. МОН89034. Фрагмент ДНК розміром 713 п.о. складається з частини гена *cry1A.105* генетичної конструкції.

Д. Т25. Фрагмент ДНК розміром 209 п.о. складається з частини *pat* гена і ділянки 35S термінатора генетичної конструкції.

На рис. 2 видно, що отримані амплікони відповідають очікуваним, наведеним у табл. 2. У досліджуваних зразках експериментальних форм кукурудзи спостерігається тільки референтні гени кукурудзи *adh1* або *zein*, що свідчить про наявність та достатню якість рослинної ДНК у зразках і відсутність трансгенів чи трансформаційних подій у генетичному матеріалі рослин. У референтних зразках спостерігаються як маркерні гени кукурудзи *adh1* або *zein*, так і амплікони очікуваних розмірів, що свідчить про адекватність підібраних умов низхідної ПЛР і про наявність трансформаційних подій. Негативні контролю не містять ніяких фрагментів, що свідчить про відсутність забруднень реактивів ДНК і належну якість проведення реакції.

**АНАЛІЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ФОРМ КУКУРУДЗИ НА НАЯВНІСТЬ ГЕНІВ,
ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ ЯКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЗЕРНА (WX ТА FL-2)**

Детекцію генів *wx* та *fl-2* проводили згідно з протоколом, наведеним вище. Для цього було

Таблиця 4

**Температура ренатурації ДНК з олігонуклеотидними праймерами
і час синтезу фрагментів цільових генів при низхідній ПЛР**

| Трансформаційна подія | № циклів | Температура ренатурації ДНК, °С | Час синтезу фрагментів цільових генів, с | Трансформаційна подія | № циклів | Температура ренатурації ДНК, °С | Час синтезу фрагментів цільових генів, с |
|-----------------------|----------|---------------------------------|--|-----------------------|----------|---------------------------------|--|
| ВТ11 | 1–14 | 65 | 17 | МОН89034 | 1–14 | 65 | 46 |
| | 15–35 | 51 | 17 | | 15–35 | 50 | 46 |
| МОН863 | 1–14 | 66 | 27 | Т25 | 1–14 | 65 | 20 |
| | 15–35 | 52 | 27 | | 15–35 | 50 | 20 |

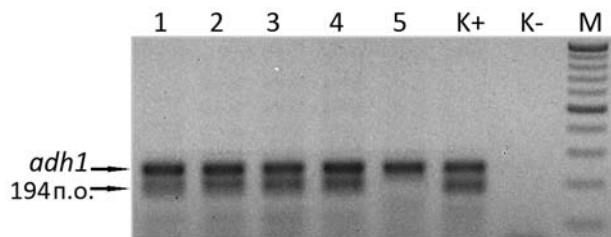


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *wx*: доріжки 1–5 – досліджувані зразки; K+ – позитивний контроль (референтний зразок, який містить ген *wx*); K- – негативний контроль; TE буфер замість зразка ДНК; M – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Референтний амплікон гена *adh1* (231 п.о.)

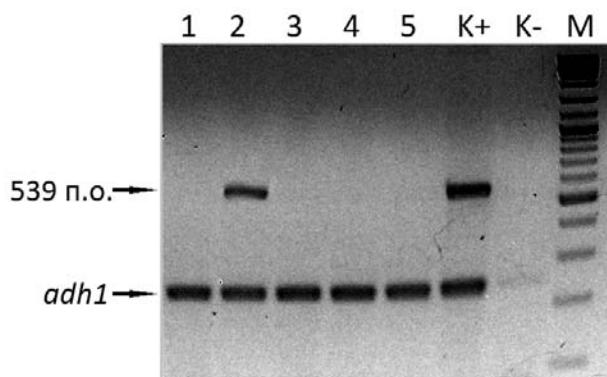


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *fl-2*: доріжки 1–5 – зразки ДНК; K+ – позитивний контроль; K- – негативний контроль (TE буфер замість зразка ДНК); M – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Референтний амплікон гена *adh1* (231 п.о.)

проведено відбір та дизайн специфічних праймерів (див. табл. 3, 4). Ген *wx* виявляли за допомогою мультиплексної ПЛР, ген *fl-2* – низхідної ПЛР.

Для виявлення гена *wx* готували реакційну суміш об'ємом 20 мкл. До її складу входили 1×DreamTaq™ Green буфер, 0,75 одиниці DreamTaq™ (Thermo Scientific) полімерази, 200 мкМ дНТФ, 30 нг зразка рослинної ДНК, 0,2 мкМ праймера ADH F3, 0,2 мкМ праймера ADH R1, 0,35 мкМ праймера W4F, 0,35 мкМ праймера W4R (табл. 5, 6). Негативним контролем була реакційна суміш з 1 мкл TE буфера рН 8,0 замість зразка ДНК. Позитивний контроль – загальна ДНК з геном *wx*.

Склад реакційної суміші об'ємом 20 мкл для виявлення гена *fl-2* був таким: 0,35 мкМ праймера FL2F, 0,35 мкМ праймера FL2R, 0,2 мкМ праймера ADH F3, 0,2 мкМ праймера ADH R1, 1×DreamTaq™ Green буфер, 0,75 одиниці DreamTaq™ полімерази (Thermo Scientific), 200 мкМ дНТФ, та 30 нг зразка ДНК. Негативним контролем була реакційна суміш з 1 мкл TE буфера рН 8,0 замість зразка ДНК. Позитивний контроль – загальна ДНК кукурудзи, яка містить ген *fl-2*.

Програма мПЛР на наявність гена *wx* була такою: денатурація рослинної ДНК – 4 хв при 94 °С; проводили 35 циклів, кожен з яких включає денатурацію ДНК протягом 30 с при 94 °С, ренатурацію рослинної ДНК з олігонук-

Таблиця 5

Перелік праймерів, температура їх плавлення та температура відпаду при проведенні ПЛР

| Ген | Праймер | Концентрація праймерів у реакційній суміші для ПЛР, мкМ | Температура плавлення, °С | Температура відпаду, °С |
|-----------------------------|---------|---|---------------------------|-------------------------|
| Референтний ген <i>adh1</i> | Adh-F3 | 0,20 | 66 | 55 |
| | Adh-R1 | 0,20 | 60 | |
| <i>wx</i> | W4F | 0,35 | 56 | 51 |
| | W4R | 0,35 | 56 | |
| <i>fl-2</i> | FL2F | 0,35 | 68 | 63 |
| | FL2R | 0,35 | 69 | |

Нуклеотидні послідовності праймерів до генів *wx* та *fl-2*

| Ген | Назва праймера | Нуклеотидна послідовність праймера | Розмір амплікону, п.о. | Специфічність |
|-----------------------------|----------------|--|------------------------|---------------------|
| Референтний ген <i>adh1</i> | Adh-F3 | 5'-CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC-3' [5] | 231 | до гена <i>adh1</i> |
| | Adh-R1 | 5'-GACAGAGGAGAAACAAGGCG-3' [5] | | |
| <i>wx</i> | W4F | 5'-AATAATCCCTGCTGTTTCGGT-3' [17] | 189 | до гена <i>wx</i> |
| | W4R | 5'-CAGCTTTTGGTGGCCAGA-3' [17] | | |
| <i>fl-2</i> | FL2F | 5'-GCCCTTTTAGTGAGCGCAACAAATGTG-3' [18] | 539 | до гена <i>fl-2</i> |
| | FL2R | 5'-GCAGGGTTTGCCATAGCTAGCTGATG-3' [18] | | |

леотидними праймерами протягом 30 с при 50 °С, синтез фрагментів цільових генів протягом 20 с при 72 °С та кінцевий синтез – протягом 10 хв при 72 °С.

Програма низхідної ПЛР на наявність гена *fl-2*: денатурація рослинної ДНК – 4 хв при 94 °С; проводили 14 циклів, кожен з яких включає денатурацію ДНК протягом 30 с при 94 °С, ренатурацію рослинної ДНК з олігонуклеотидними праймерами протягом 30 с при 66 °С (кожен цикл температура знижується на 1 °С), синтез фрагментів цільових генів протягом 36 с при 72 °С. Проводили 21 цикл, кожен з яких включає денатурацію ДНК протягом 30 с при 94 °С, ренатурацію рослинної ДНК з олігонуклеотидними праймерами протягом 30 с при 52 °С, синтез фрагментів цільових генів протягом 36 с при 72 °С; кінцевий синтез фрагментів цільових генів проводили протягом 10 хв при 72 °С.

Продукти ПЛР являють собою фрагменти цільових генів, які мають характерну довжину: фрагмент власного гена кукурудзи *adh1* розміром 231 п.о.; фрагмент власного алелю гена кукурудзи *wx* розміром 194 п.о. (при виявленні *wx*); фрагмент ДНК розміром 539 п.о. – частина гена 24-кДа α -zein (при виявленні *fl-2*) (табл. 4, рис. 3, 4).

На рис. 3 і 4 спостерігаються амплікони, які відповідають референтному гену кукурудзи *adh1* розміром 231 п.о. Це говорить про високу якість виділення загальної ДНК та проход-

ження реакції ПЛР. На доріжці з позитивним контролем отримано ампліфікований фрагмент цільової послідовності – 194 п.о. (рис. 3) та 539 п.о. (рис. 4). Амплікон 194 п.о. спостерігався у більшості зразків (рис. 3, доріжки 1–4), у той час як амплікон 539 п.о. (рис. 4, доріжка 2) значно рідше. Ген *wx* виявився дуже поширеним в експериментальних зразках кукурудзи – його знайдено у 192-х проаналізованих зразках. Ген *fl-2* знайдено у 41-му селекційному зразку.

ВИСНОВКИ

Таким чином, розроблені нами методики мультиплексної ПЛР і низхідної ПЛР дозволяють детектувати гени стійкості до стресових факторів (*pat (bar)*, CP4 *epsps*, *mepps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *mcry3A*), які входять до складу трансформаційних подій (Bt11, Bt176, DAS1507, GA21, MON810, MON863, NK603, T25, DAS59122, MON89034, MON88017, MIR604) надійно, достовірно, ефективно і швидко. Методики застосовні для аналізу великої кількості зразків кукурудзи.

Серед досліджених 200 експериментальних форм кукурудзи НВФГ «Компанія "Маїс"» щодо наявності генів, які детермінують стійкість до стресових факторів, жодного трансгена (*bar (pat)*, *mepps*, CP4 *epsps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *mcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*) виявлено не було. В результаті дослідження

цих же форм щодо наявності генетичних послідовностей, які детермінують якісні характеристики зерна, знайдено ген *fl-2* у 41-му селекційному зразку кукурудзи. Ген *wx* знайдено у 192-х проаналізованих зразках.

Робота проводилася в рамках науково-технічного проекту П-4-12 «Виявлення генетичних послідовностей, що детермінують якісні характеристики зерна і стійкість до стресових факторів, у кукурудзи» (реєстраційний номер 0112U002802, 2012 р.).

За результатами проведених робіт були отримані патенти України на корисну модель [19, 20].

ЛІТЕРАТУРА

1. *European Commission. Food and Feed Safety. Food Safety – From the Farm to the Fork.* http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm.
2. Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» // Відомості Верховної Ради України (ВВР). – 2007. – N 35. – С. 484.
3. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армтидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений / Дрейпер Дж. Пер. с англ. Г.И. Эйсер, В.М. Андрианова. – М.: Мир, 1991. – С. 408.
4. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. 2003. – P. 1600.
5. Center for Environmental Risk Assessment (CERA). GM Stop Database. Режим доступу: <http://www.cera-gmc.org>.
6. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis / Qualitative PCR method for detection of maize event Bt176 (ISO/FDIS 21569:2005).
7. GMO Detection Method Database (GMDD). Режим доступу: <http://gmdd.shgmo.org>.
8. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis / Qualitative PCR method for detection of maize event MON810 (ISO/FDIS 21569:2005).
9. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EU-RL GMFF). EU Database of Reference Methods for GMO Analysis. Режим доступу: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>.
10. Patent 0070139 USA. A01H 5/00, C12Q 1/68, C07H 21/04, C12N 15/82, C12N 5/04, A01H 1/00. Corn Event DAS-59122-7 And Methods For Detection Thereof / Bing J.W., Cressman R.F. JR, Gupta M., Hakimi S.M. at all; Pioneer Hi-Bred international, Inc.; Dow AgroSciences LLC; E.I. DuPont deNemours and Company. – Publication date Mar.30, 2006. Pub. No.:US2006/0070139 A1.
11. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis / Quantitative PCR method for detection of maize event GA21 (ISO/FDIS 21569:2005).
12. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis / Quantitative PCR method for detection of maize event NK603 (ISO/FDIS 21569:2005).
13. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis / Qualitative PCR method for detection of maize event Bt11 (ISO/FDIS 21569:2005).
14. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis / Qualitative PCR method for detection of maize event T25 (ISO/FDIS 21569:2005).
15. Huang Hsin-Ying, Pan Tzu-Ming. Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods // J. Agric. Food Chem. – 2004. – № 52. – P. 3264–3268.
16. Hecker K., Roux K. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR // Biotechniques. – 1996. – 20, 3. – P. 478–485.
17. Dang Ngoc-Chi. Improvement of protein quality in waxy maize (*Zea mays* L.) by doubled haploid and marker assisted selection techniques. Dissertation by Ngoc-Chi Dang, ETH Zurich, 2010. Nr. 19099.
18. Coleman G., Clore A., Ranch J. et al. Expression of mutant α -zein creates the *floury2* phenotype in transgenic maize // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – v. 94, № 13. – P. 7094–7097.
19. Пат. 77768 Україна, МПК C12N 15/31; C12N 15/32; C12N 15/82; C12Q 1/68; C12P 19/34. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи NK603 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / Моргун Б.В., Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О.; заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ. – № u2012 10121; заявл. 23.08.2012; опубл. 25.02.2013, Бюл. №4.
20. Пат. 77769 Україна, МПК C12N 15/31; C12N 15/32; C12N 15/82; C12Q 1/68; C12P 19/34. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи MON810 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / Моргун Б.В., Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О.; заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ. – № u2012 10122; заявл. 23.08.2012; опубл. 25.02.2013, Бюл. №4.

А.В. Марковський, М.А. Банникова,
В.В. Борисова, Т.В. Федоренко, Б.В. Моргул

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНОВ,
ДЕТЕРМИНИРУЮЩИХ КАЧЕСТВЕННЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕРНА И УСТОЙЧИВОСТЬ
К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ, У КУКУРУЗЫ

Осуществлена оценка 200 экспериментальных форм кукурузы НПФХ «Компания "Маис"» относительно наличия генов, детерминирующих качественные характеристики зерна (гены *wx* и *fl-2*), устойчивость к гербицидам (гены *bar (pat)*, *epsps*) и насекомым (*cry*-гены). Проведено выделение общей ДНК из живой растительной ткани кукурузы, подбор и дизайн праймеров для обнаружения генов *wx*, *fl-2*, *bar (pat)*, *mepsps*, CP4 *epsps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *mcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*. Разработаны методики мультиплексной и нисходящей (Touchdown) полимеразной цепной реакции (ПЦР) и проведена амплификация определенных последовательностей. Среди проанализированных 200 экспериментальных форм кукурузы НПФХ «Компания "Маис"» ни одного трансгена (*bar (pat)*, *mepsps*, CP4 *epsps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *mcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*) обнаружено не было, в то время как ген *fl-2* найден в 41-м образце, ген *wx* выявлен в 192-х проанализированных образцах.

Ключевые слова: кукуруза, трансгены, качественные характеристики зерна, праймеры, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

O.V. Markovskiy, M.O. Bannikova,
V.V. Borisova, T.V. Fedorenko, B.V. Morgun

DETECTION OF GENES
THAT DETERMINE QUALITY
CHARACTERISTICS OF GRAIN
AND RESISTANCE TO STRESS
FACTORS, IN MAIZE

200 experimental maize samples (Maize Company) were examined for the presence of genes that determine the quality characteristics of grain (*wx* and *fl-2* genes), herbicide (*bar (pat)*, *epsps* genes) and insect (*cry*-genes) resistance. The total DNA was extracted from maize living plant tissue. Primers to detect *wx*, *fl-2*, *bar (pat)*, *mepsps*, CP4 *epsps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *mcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* genes were designed and selected. Multiplex and Touchdown PCR were worked out. PCR amplification of certain sequences was carried out. No transgenes (*bar (pat)*, *mepsps*, CP4 *epsps*, *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *mcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*) were found among 200 analyzed experimental maize samples. At the same time, *fl-2* gene was found in 41 samples, *wx* gene was found in 192 analyzed samples.

Key words: maize, transgenes, grain quality characteristics, primers, polymerase chain reaction (PCR).

Стаття надійшла до редакції 10.06.13