
МЕТОДИКИ

УДК 604.6:633.52:606.63

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Л.М. Кожемякина

Институт біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

Наведено результати досліджень з підбору та оптимізації методики виділення сумарної РНК з трансгенних рослин цукрового буряку для проведення реакції зворотної транскрипції і оцінки експресії трансгенів. Вивчено застосування двох принципово різних способів: метод екстракції РНК за допомогою фенолу з різними температурними режимами інкубації і виділення РНК з сорбентом. Зважаючи на кількісну і якісну оцінку отриманих препаратів, було встановлено, що найефективнішим є фенольний метод з температурою інкубації 60°C.

Ключові слова: виділення РНК, полімеразна ланцюгова реакція, трансгенний цукровий буряк.

В процессе интенсивного развития генетической инженерии и быстрого распространения генетически модифицированных организмов (ГМО) важным заданием в данное время является поиск новых подходов мониторинга ГМО с помощью молекулярно-генетических методов, которые значительно ускоряют процесс создания и контроля использования трансгенных растений. Для оценки экспрессии встроенных генов используют метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), поскольку факта наличия определенных конструкций в ДНК растения не достаточно для выводов об эффективности работы интродуцированных генов [1].

В частности, стабильность генетических конструкций в геноме трансгенных растений сахарной свеклы и их экспрессия недостаточно изучены, поэтому выяснение эффективности проявления трансгенов в растениях сахарной свеклы является актуальным. Цель работы — подбор методики и оптимизация условий экстракции тотальной РНК из трансгенных растений сахарной свеклы.

© Л.М. Кожемякина, 2014

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали растения сахарной свеклы, которые содержат ген устойчивости к гербициду широкого спектра действия Roundup, действующим веществом которого является глифосат. Исследуемая генетическая конструкция включает последовательность 35S-промотора, NOS-терминатора и CP4 EPSPs-гена (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene). Для оценки экспрессии гена интереса с помощью ОТ-ПЦР суммарную РНК получают из растительных тканей трансгенных растений, поэтому для получения материала трансгенных растений сахарной свеклы использовали метод культивирования *in vitro* [2].

На основе анализа литературных данных [3, 4] нами был подобран способ стерилизации семенного материала сахарной свеклы, который включал промывку семян мыльной водой в течение 2 мин. с последующим замачиванием (несколько секунд) промытых семян в 90% растворе этилового спирта. Стерильные семена высаживали на безгормональную, с разведенным наполнителем минеральным составом, питательную

среду Мурашиге-Скуга (MS) и культивировали при температуре +25°C и освещении 4 клк с 16-часовым фотопериодом [4]. Полученные растения сахарной свеклы были проанализированы на наличие составляющих исследуемой генетической конструкции с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5].

Экстракцию ДНК проводили согласно соответствующей методике, разработанной с использованием катионного детергента ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) [6].

Для обнаружения промоторных участков генетической конструкции (промотор 35S вируса мозаики цветной капусты) в растениях сахарной свеклы использовали метод ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов реакции. В исследованиях использовали набор реактивов для детекции ГМО методом ПЦР GenPac GMO-35S PCR test (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Амплификацию ДНК проводили согласно рекомендаций производителя: начальная денатурация при 95°C — 2 мин.; основная денатурация при 95°C — 60 с; гибридизация праймеров при 58°C — 40 с; элонгация при 74°C — 60 с; всего — 45 циклов.

Для идентификации терминаторных участков генетических конструкций и гена интереса в растениях сахарной свеклы использовали мультиплексную тест-систему для ПЦР в реальном времени, которая включала праймеры и флуорисцентные зонды для обнаружения NOS-терминатора и CP4 EPSPs-гена («Синтол», Россия). Пробирки с реакционной смесью помещали в амплификатор iQTM5 Optical Module (Bio-Rad, США) в порядке, заданном с помощью компьютерной программы Bio-Rad iQ5 (version 2.0) со следующими параметрами: начальная денатурация при 95°C — 5 мин.; основная денатурация при 95°C — 15 с; гибридизация праймеров и элонгация при 61°C — 40 с, 45 циклов. Растения сахарной свеклы, в геноме которых были обнаружены генетические конструкции, включающие ген интереса, были использованы для выделения РНК.

При экстракции суммарной РНК из растений сахарной свеклы были использованы два подхода: метод выделения РНК с помощью фенола с разными температурными режимами инкубации и набор реактивов для выделения РНК с сорбентом.

С целью выделения РНК с помощью фенола был использован набор реагентов Trizol RNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Процедура выделения РНК в соответствии с данным методом состоит из последующих стадий: лизис клеток в присутствии гуанидинтиоцианата и фенола, очищение препарата РНК от белков и фенолов хлороформом и осаждение нуклеиновой кислоты изопропиловым спиртом. По литературным данным [7–10], при использовании Trizol-реагента применяют разные температурные режимы инкубации: инкубирование образцов при 60°C, при комнатной температуре и при 4°C. Пробы растительного материала массой 100 мг растирались в охлажденной ступке на льду с 1 мл Trizol-реагента, полученный гомогенат переносили в пробирки типа Eppendorf и инкубировали при указанных температурных режимах в течение 5 мин. В пробирки добавляли 200 мкл хлороформа и инкубировали при 4°C — 5 мин. Суспензию центрифугировали 5 мин. при 14000 об./мин., затем отобрали супернатант в чистую пробирку и добавили двойной объем изопропилового спирта. Полученную смесь инкубировали при –20°C в течение 30 мин. с последующим центрифугированием на протяжении 15 мин. при 14000 об./мин. Осадок промывали 75% раствором этилового спирта и подсушивали при температуре 65°C — 3 мин. В качестве растворителя использовали реагент Экстра-Ген Е, который входит в состав набора.

С целью выделения РНК с помощью сорбента использовали комплект реагентов (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). В соответствии с инструкцией производителя, при выделении РНК из растительного материала с помощью сорбента выделяют следующие этапы: лизис клеточных мембран, адсорбция РНК на силикатный сорбент при определенном значении рН и в присутствии солевого буфера, отмывка

РНК от белков и фенольных соединений спиртовыми растворами, удаление сорбента и растворение РНК в буфере. Оценку количества и качества суммарной РНК проводили с использованием спектрофотометра. Препарат РНК считается чистым, если отношение значений максимумов поглощения при длинах волн 260/280 нм приближается к значению 2,8 [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы получены стерильные проростки сахарной свеклы, которые в дальнейшем культивировали на регенерационной питательной среде MS в модификации Коломиец Ю.В. (2004 г.). Эффективность стерилизации составила 96%, количество жизнеспособных эксплантов — 88%. Таким образом, выбранный способ стерилизации и культивирования *in vitro* семенного материала является достаточно эффективным для трансгенных растений сахарной свеклы. Стерильные растения использовали для детекции составляющих генетической конструкции методом ПЦР.

Суммарную ДНК для проведения реакции амплификации выделяли с использованием ЦТАБ, который при определенной концентрации соли образует нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами. На последующих этапах выполняли отмыв-

ку и очистку ДНК от детергента. Концентрация ДНК для образцов находилась в пределах 500–700 мг/мл, значения показателя чистоты составляли 1,8–1,93. Следовательно, количество и качество выделенной ДНК свидетельствует о том, что выбранная методика выделения ДНК из небольшого количества растительного материала позволяет получить высокоочищенную ДНК с концентрацией не менее 400 мг/мл, которую можно использовать для проведения ПЦР с целью идентификации генетически модифицированных организмов.

Для идентификации 35S-промотора использовали метод ПЦР с разделением продуктов реакции в агарозном геле (рис. 1), для NOS-терминатора и CP4 EPSPs-гена — метод мультиплексной ПЦР в реальном времени (рис. 2).

В результате электрофоретического разделения продуктов амплификации в агарозном геле было установлено наличие ампликонов размером 194 п.н., соответствующих последовательности 35S-промотора в контрольном положительном образце и их отсутствие на треке отрицательного контроля, что позволило сделать вывод о достоверности полученных данных и отсутствии контаминации. Наличие ампликонов указанного размера на треках № 3, 5, 6 свидетельствует о присутствии 35S-промоторной области в образцах, соответствующих данным трекам.

Результатом ПЦР-анализа в реальном времени является график флуоресценции исследуемых образцов ДНК и цифровые данные сравнения графиков накопления продуктов амплификации (рис. 2). Определение числовых значений по пороговому циклу накопления продукта реакции для исследуемых образцов проводили на экспоненциальном интервале, так как на данном участке эффективность реакции близка к максимальной во всех образцах.

Полученные данные свидетельствуют о присутствии последовательностей ДНК NOS-терминатора в двух образцах № 3 и № 4 (пороговые циклы по красителем FAM (карбоксифлуоресцеин) — тридцать

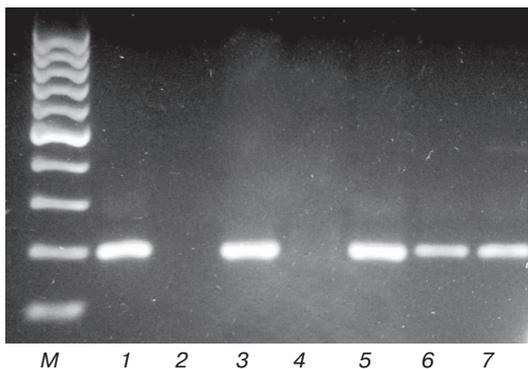


Рис. 1. Результаты разделения продуктов реакции в агарозном геле: М — маркер молекулярной массы (GeneRuler™ 100 bp) 1 — положительный контроль, 2 — отрицательный контроль, 3–7 — исследуемые образцы ДНК

Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Set Point
B02	FAM	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B03	FAM	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	FAM	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B06	FAM	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	FAM	Pos Ctrl	ПК	1	27,75	27,75	N/A	N/A
B09	FAM	Pos Ctrl	ПК	1	27,05	00,00	N/A	N/A
F02	FAM	Unkn	Тр3/3	3	N/A	00,00	N/A	N/A
F05	FAM	Unkn	Тр3/2	4	34,55	34,55	N/A	N/A
F08	FAM	Unkn	Тр3/1	5	34,63	34,63	N/A	N/A
B02	Cy5	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B03	Cy5	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	Cy5	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B06	Cy5	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	Cy5	Pos Ctrl	ПК	1	26,34	26,48	0,192	N/A
B09	Cy5	Pos Ctrl	ПК	1	26,61	26,48	0,192	N/A
F02	Cy5	Unkn	Тр3/3	3	39,98	39,98	N/A	N/A
F05	Cy5	Unkn	Тр3/2	4	30,80	30,80	N/A	N/A
F08	Cy5	Unkn	Тр3/1	5	33,89	33,89	N/A	N/A

Рис. 2. Числовые данные сравнения графиков накопления продуктов амплификации для трех образцов растений сахарной свеклы

четвертый) и CP4 EPSPs-гена в трех образцах № 2, 3, 4 (пороговые циклы по красителю Cy5 – тридцать девятый, тридцатый и тридцать третий).

В результате проведенных исследований, из проанализированных растений сахарной свеклы были отобраны генотипы с разным компонентным составом генетических конструкций: образцы со всеми составляющими генетических конструкций (35S-промотор, NOS-терминатор и CP4 EPSPs), с отсутствующей промоторной или обеими регуляторными последо-

вательностями. Данные растения трансгенной сахарной свеклы использовали для выделения тотальной РНК для оценки экспрессии генов интереса.

Экстракцию РНК проводили двумя методами: с использованием гуанидинтиоцианата и фенола в составе Trizol-реагента и метод выделения РНК на силикатном сорбенте в присутствии солевого буфера. Для количественной и качественной оценки полученных препаратов измеряли концентрацию и чистоту суммарной РНК (таблица).

Концентрация и чистота исследуемой РНК

№ п/п	Фенольный метод экстракции, температура инкубации						Экстракция РНК на сорбенте	
	60°C		24°C		4°C		Конц., мг/мл	Чистота 260/280
	Конц., мг/мл	Чистота 260/280	Конц., мг/мл	Чистота 260/280	Конц., мг/мл	Чистота 260/280		
1	555,5	1,68	510,3	1,02	871,1	1,06	64,5	1,53
2	831,7	1,24	648,0	1,17	782,7	1,00	45,0	1,96
3	635,9	1,57	783,7	1,03	655,4	1,10	62,0	1,84
4	1273,5	1,25	1356,9	1,13	458,2	0,86	61,1	1,64
5	959,0	1,43	809,9	1,19	689,4	0,96	64,8	1,72

Исходя из данных таблицы, наибольшее количество суммарной РНК было получено с использованием фенольной экстракции (500–900 мг/мл), значение чистоты находилось в пределах 1,0–1,6. Концентрация РНК, полученной с использованием сорбента, составляла 40–70 мг/мл, а показатель чистоты — 1,8–2,0. Также, данные таблицы свидетельствуют о том, что температура инкубации при экстракции РНК из растений сахарной свеклы фенольным методом оказывает влияние на выход и чистоту нуклеиновой кислоты. Так, концентрация суммарной РНК, полученной путем инкубации при температуре 60°C и 24°C, не имеет существенных отличий и составляет 500–1200 мг/мл; также высокое значение концентрации отмечено для варианта с температурой 4°C — 450–800 мг/мл. Однако, если сравнивать чистоту препаратов РНК, то можно отметить, что меньше всего примесей содержится в варианте с температурой инкубации 60°C (значение чистоты находится в пределах 1,2–1,6), тогда как в двух других вариантах оно колеблется от 1,0 до 1,2, что свидетельствует о высоком содержании в данных препаратах РНК-веществ, которые способны ингибировать реакцию обратной транскрипции и влиять на выход к ДНК. Стоит учесть также, что чистота РНК при выделении на сорбенте существенно выше, чем при фенольной экстракции (1,5–1,9), но низкая концентрация показывает, что данный метод является менее предпочтительным для выделения РНК из растений сахарной свеклы при оценке экспрессии интродуцированных генов.

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований по идентификации CP4 EPSPs-гена, промоторных и терминаторных участков генетической конструкции была сформирована выборка из генотипов трансгенных растений сахарной свеклы с разными вариантами состава конструкции. Полученные данные свидетельствуют, что состав компо-

нентов конструкции в исследуемых образцах трансгенных растений сахарной свеклы позволяет провести оценку эффективности экспрессии генов интереса. В результате работы было установлено, что для проведения реакции обратной транскрипции и оценки экспрессии трансгенов в растениях сахарной свеклы наиболее предпочтительным является метод выделения РНК с использованием фенола с температурой инкубации 60°C на протяжении 5 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левенко Б. Трансгенні культури у світі та Україні / Б. Левенко // Вісн. НАН України. — 2011. — № 9. — С. 31–41.
2. Епринцев А.П. Идентификация и исследование экспрессии генов / А.П. Епринцев, В.Н. Попов, Д.Н. Федорин. — Воронеж, 2008. — 64 с.
3. Головки А.Е. Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.) в культурі *in vitro*: регенерація, морфогенез і генетична трансформація: автореф. ... канд. біол. наук / А.Е. Головки. — К.: Ін-т клітинної біології та генетичної інженерії. — 2003. — 20 с.
4. Коломієць Ю.В. Особливості морфогенезу цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.) культури *in vitro* / Ю.В. Коломієць // Аграрна наука і освіта. — 2004. — Т. 5, № 5–6. — С. 21–26.
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. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / [под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена]. — М.: Мир, 1991. — 408 с.
7. 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.
8. Logemann J. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues / J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer // Anal. Biochem. — 1987. — Vol. 163, No. 1. — P. 16–20.
9. Создание устойчивых к глифосату растений *Brassica napus* L., экспрессирующих десатуразу DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus* / Л.А.Сахно, И.М. Герасименко, И.К. Комарницкий и др. // Biopolymers and Cell. — 2012. — Vol. 28, No. 6. — P. 449–455.
10. Выделение высококачественной РНК из различных тканей *Populus* / М. Су, В. Цзан, Н. Яо, М. Хуан // Физиология растений. — 2009. — Т. 56, № 5. — С. 155–159.