



УКРАЇНА

(19) UA (11) 51842 (13) U  
(51) МПК (2009)  
C12N 15/00  
C12Q 1/25  
C12Q 1/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ДЕТЕКЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ГЕНА АЦИЛ-ЛІПІДНОЇ ДЕСАТУРАЗИ, ЗЛИТОЇ З ТЕРМОСТАБІЛЬНОЮ ЛІХЕНАЗОЮ, В ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНІЙ РОСЛИНІ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

1

(21) u200912102

(22) 25.11.2009

(24) 10.08.2010

(46) 10.08.2010, Бюл.№ 15, 2010 р.

(72) ГЕРАСИМЕНКО ІРИНА МИХАЙЛІВНА, СІН-ДАРОВСЬКА ЯНА РУДОЛЬФІВНА, ШЕЛУДЬКО ЮРІЙ ВСЕВОЛОДОВИЧ, БЕРДІЧЕВЕЦ ІРИНА НІКОЛАЄВНА, RU, ШІМШІЛАШВІЛІ ХРІСТІНА РОМАНОВНА, RU, ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА ІРИНА ВАСІЛЬЄВНА, RU

(73) ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАНУ, ІНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ІМ. Н.І. ВАВІЛОВА РАН, RU

(57) Спосіб детекції рекомбінантного гена ацил-ліпідної десатурази, злитої з термостабільною ліхеназою, в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції, для здійснення якого проводять денатурацію рослинної ДНК; цикли, кожен з яких включає денатурацію ДНК, ренатурацію рослинної ДНК з

2

олігонуклеотидними праймерами, синтез фрагментів цільових генів, який **відрізняється** тим, що для проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції використовують пари олігонуклеотидних праймерів, комплементарних до рекомбінантного гена ацил-ліпідної десатурази, злитої з термостабільною ліхеназою, генів актину та  $\alpha$ -субодиниці GTP-зв'язуючого білка тютюну, генів virD1 та virE Agrobacterium tumefaciens, гена nptII і термінатора гена нопалінсинтази, та проводять ампліфікацію за наступних умов: денатурація рослинної ДНК протягом 5 хв. при 94 °C; 30 циклів, кожен з яких включає денатурацію ДНК протягом 30 сек. при 94 °C, ренатурацію рослинної ДНК з олігонуклеотидними праймерами протягом 45 сек. при 61 °C, синтез фрагментів цільових генів протягом 45 сек. при 72 °C; синтез фрагментів цільових генів протягом 5 хв. при 72 °C.

Корисна модель відноситься до молекулярної біології та біотехнології. Запропонована корисна модель може бути застосована для дослідницьких робіт по отриманню генетично модифікованих рослин, які несуть рекомбінантні гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, злиті з репортерним геном термостабільної ліхенази, та для детекції таких рослин в навколишньому середовищі. Бажаний технологічний результат досягається завдяки використанню декількох пар праймерів, що забезпечують одночасну ампліфікацію фрагментів цільових генів.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) передбачає ампліфікацію за допомогою ДНК-полімерази ділянки ДНК, яка обмежена двома різноспрямованими олігонуклеотидними праймерами [1]. Використання термостабільних ДНК-полімераз зробило цю методику зручною та загальнозживаною [2]. Ампліфікація декількох фрагментів ДНК в ході од-

нієї реакції отримала назву мультиплексної ПЛР (МПЛР). Вперше МПЛР було застосовано для аналізу різних ділянок гену дістрофіну людини [3]. На сьогодні цей підхід широко використовується для детекції чужорідних генів, перенесених в рослини. Для кожного гену підбирається пара праймерів, за допомогою якої можна провести ампліфікацію ділянки, що має характерну довжину, зручну для ідентифікації після електрофоретичного розділення. Для контролю якості виділеної ДНК проводиться ампліфікація фрагментів власних генів рослин (внутрішній позитивний контроль). Якщо генетична трансформація відбувається за допомогою агробактерій, необхідно також підтвердити відсутність забруднення рослинної ДНК слідовими кількостями ДНК агробактерій (негативний контроль). Для цього використовують праймери, комплементарні до одного з генів вірулентності, які не

(13) U

(11) 51842

(19) UA

переносяться в рослинну клітину під час трансформації.

Найближчим аналогом запропонованої корисної моделі є МПЛР система для визначення найбільш розповсюджених генетичних елементів, які переносяться в різні види рослин, а саме генів *aadA*, *bar*, *hpt*, *nptII*, *pat*, *uidA* [4]. Згідно з цим методом для проведення МПЛР використовують олігонуклеотидні праймери, комплементарні до перерахованих генів, і проводять ампліфікацію за наступних умов: денатурація рослинної ДНК протягом 10хв при 95°C; 40 циклів, кожен з яких включає денатурацію ДНК протягом 50сек при 95°C, ренатурацію рослинної ДНК з олігонуклеотидними праймерами протягом 50сек при 59°C, синтез фрагментів цільових генів протягом 50сек при 72°C; синтез фрагментів цільових генів протягом 5хв при 72°C [4]. В літературі не описана МПЛР для визначення генів ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, злитих з термостабільною ліхеназою, перенесених в рослини. Ці гени кодують ферменти, які каталізують утворення подвійних зв'язків в жирних кислотах клітинних мембран, що може призводити до підвищення холодостійкості генетично модифікованих рослин [5]. Для моніторингу експресії перенесених генів використовують рекомбінантні гени десатураз, злиті в одній рамці зчитування з геном термостабільної ліхенази. Цей ген кодує фермент, активність якого можна визначати простим та надійним методом [6].

Об'єктом даної корисної моделі є спосіб детекції в генетично модифікованій рослині рекомбінантного гену ацил-ліпідної десатурази, злитої з термостабільною ліхеназою, методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції. Технічною задачею даної корисної моделі було створення способу одночасної ампліфікації фрагментів цільових генів з рослинної ДНК. Відповідно до даної корисної моделі для здійснення ампліфікації фрагментів цільових генів послідовно виконують наступні дії:

1. проводять денатурацію рослинної ДНК протягом 5хв при 94°C;
2. проводять 30 циклів, кожен з яких включає денатурацію ДНК протягом 30сек при 94°C, ренатурацію рослинної ДНК з олігонуклеотидними праймерами протягом 45сек при 61°C, синтез фрагментів цільових генів протягом 45сек при 72°C;
3. проводять синтез фрагментів цільових генів протягом 5хв при 72°C.

Для проведення МПЛР використовують праймери наступних нуклеотидних послідовностей, комплементарні до відповідних генів:

*licBM3-1* GTCGTAATAACGCCCTTTGTGTCAC  
*licBM3-2* GTTAGGATAGTATTTTACATATTCG  
 (для ампліфікації фрагмента гена *licBM3*);  
*desA-1* GTTGACACCAACGGTAACGCC  
*desA-2* CCAGTTAAAGGTGCGCTCGTAA  
 (для ампліфікації фрагмента гена *desA*);  
*desC-1* CCTCAATTGGGGCTTTGTCTTC  
*desC-2* AACTGATACCTTGGCGGCAAGA  
 (для ампліфікації фрагмента гена *desC*);  
*Actin-1* TTTGCTGGAGATGATGC  
*Actin-2* CTTGAATGGCGACATAC  
 (для ампліфікації фрагмента гена актина);

*NtGA-1* ACAGTTGCCCTTGCTTATCGC  
*NtGA-2* TTCAACACGAACGGAACAGAC  
 (для ампліфікації фрагмента гена  $\alpha$ -субодиниці GTP-зв'язуючого білка);  
*virD1-1* ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCCA  
*virD1-2* GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA  
 (для ампліфікації фрагмента гена *virD1* штаму GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*);  
*virE-1* CGAATACATTCTCGTGCGTCAAACG  
*virE-2* TTTTCGAGTCATGCATAATGCCTGAC  
 (для ампліфікації фрагмента гена *virE* штаму AGL0 *A. tumefaciens*);  
*nptII-1* GAACAAGATGGATTGCACGCAGGT  
*nptII-2* TCGTCCAGATCATCCTGATCGACA  
 (для ампліфікації фрагмента гена *nptII*);  
*Tnos-1* CGATAATTTATCCTAGTTTGC GCG  
*Tnos-2* TGAATCCTGTTGCCGGTCTTC  
 (для ампліфікації фрагмента термінатора гена *нопалінсинтази*).

В МПЛР використовують різні комбінації пар праймерів в залежності від особливостей експерименту (штаму *A. tumefaciens* та цільових і селективних генів, використаних для трансформації рослин).

Продукти МПЛР являють собою фрагменти цільових генів, які мають характерну довжину, що дозволяє розрізнити їх після електрофоретичного розділення в агарозному гелі: 642 пар основ (п.о.) для гена *licBM3*, 949п.о. для гена *desA*, 777п.о. для гена *desC*, 351п.о. для гена актина тютюну, 609п.о. для гена  $\alpha$ -субодиниці GTP-зв'язуючого білка тютюну, 432п.о. для гена *virD1*, 600п.о. для гена *virE*, 473п.о. для гена *nptII*, 188п.о. для термінатора гена *нопалінсинтази*.

Результатом здійснення запропонованої корисної моделі є ампліфікація фрагментів цільових генів з рослинної ДНК, що дозволяє визначити присутність в геномі рослини перенесеного рекомбінантного гену ацил-ліпідної десатурази, злитої з термостабільною ліхеназою, а також підтвердити відсутність забруднення агробактеріями та придатність препарату ДНК для проведення ПЛР.

Бажаний результат досягають внаслідок використання для МПЛР розробленого набору праймерів та підібраних умов для одночасної ампліфікації фрагментів цільових генів.

Запропоновану корисну модель було здійснено для детекції рекомбінантних генів ацил-ліпідних десатураз, злитих з термостабільною ліхеназою, в генетично модифікованих рослинах тютюну, арабідопсису, рапсу, салату та картоплі.

На Фіг.1 показано результати МПЛР з використанням п'яти пар праймерів *desA-1/desA-2*, *desC-1/desC-2*, *licBM3-1/licBM3-2*, *Actin-1/Actin-2*, *virD1-1/virD1-2* для детекції в рослинах тютюну, трансформованих за допомогою штаму GV3101 *A. tumefaciens*, перенесених рекомбінантних генів ацил-ліпідних десатураз *desA* та *desC* ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 та термостабільної ліхенази *licBM3* *Clostridium thermocellum*. На гель було нанесено маркер довжини фрагментів ДНК (М), суміш для МПЛР з ДНК нетрансформованого тютюну (К), з ДНК тютюну, трансформованого гібридним геном *desA-licBM3* (Т1), з ДНК тютюну, трансформованого гібридним геном *desA-licBM3*

та геном *desC* (T2), з ДНК штаму GV3101 *A. tumefaciens* (A). Стрілками показано ампліфіковані фрагменти генів *desA* (949п.о.), *desC* (777п.о.), *licBM3* (642п.о.), *актину* (351п.о.), *virD1* (432п.о.) та довжину молекул ДНК в складі маркера.

Було показано придатність запропонованих праймерів для ампліфікації фрагментів відповідних генів з ДНК різних видів рослин (тютюн - *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, рапс - *Brassica napus*, салат - *Lactuca sativa*, картопля - *Solanum tuberosum*). На Фіг.2 показано результати МПЛР з використанням двох пар праймерів *desA-1/desA-2*, *licBM3-1/licBM3-2* для детекції в рослинах арабідопсису перенесеного рекомбінантного гену *desA-licBM3* (М - маркер довжини фрагментів ДНК; А1 - ДНК ГМ рослини, А2 - ДНК контрольної нетрансформованої рослини); МПЛР з використанням двох пар праймерів *desA-1/desA-2*, *licBM3-1/licBM3-2* для детекції в рослинах рапсу перенесеного рекомбінантного гену *desA-licBM3* (М - маркер довжини фрагментів ДНК; Р1 - ДНК контрольної нетрансформованої рослини, Р2 - ДНК ГМ рослини); МПЛР з використанням трьох пар праймерів *desA-1/desA-2*, *desC-1/desC-2*, *licBM3-1/licBM3-2* для детекції в рослинах салату перенесених рекомбінантних генів *desA-licBM3* та *desC-licBM3* (М - маркер довжини фрагментів ДНК; С1 - ДНК контрольної нетрансформованої рослини, С2 - ДНК рослини, трансформованої геном *desC-licBM3*; С3 - ДНК рослини, трансформованої геном *desA-licBM3*); МПЛР з використанням чотирьох пар праймерів *desA-1/desA-2*, *licBM3-1/licBM3-2*, *npII-1/npII-2*, *Tnos-1/Tnos-2* для детекції в рослинах картоплі перенесених генів *desA-licBM3*, *npII* та термінатора гена *нопалінсинтази* (М - маркер довжини фрагментів ДНК; К1 - суміш для МПЛР без ДНК; К2 - ДНК ГМ рослини). Стрілками показано ампліфіковані фрагменти генів *desA* (949п.о.), *desC* (777п.о.), *licBM3* (642п.о.), *npII* (473п.о.) та

термінатора гена *нопалінсинтази* (188п.о.) та довжину молекул ДНК в складі маркера.

Запропонований спосіб детекції рекомбінантного гену ацил-ліпідної десатурази, злитої з термостабільною ліхеназою, в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції має наступні переваги: значне зниження затрат часу та матеріалів; можливість проведення реакції з препаратами ДНК різних видів рослин; можливість детекції забруднення різними штамми *A. tumefaciens*.

[1] Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / RK Saiki, S Scharf, F Faaloon, KB Mullis, GT Horn, HA Erlich, and N Arnheim // Science, 1985, v. 230, p. 1350-1354.

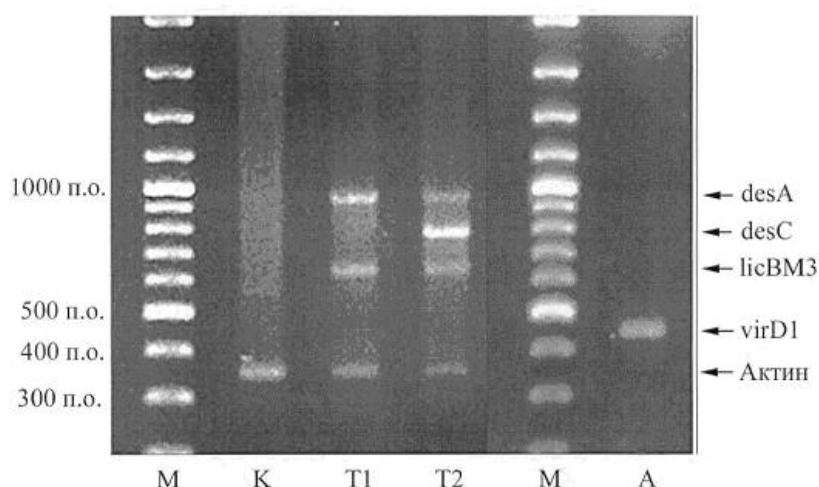
[2] Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / RK Saiki, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis, and HA Erlich // Science, 1988, v. 239, p. 487-491.

[3] Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex PCR amplification / Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT // Nucleic Acid Res., 1988, v. 16, p. 11141-11156.

[4] Multiplex PCR-based Simultaneous Amplification of Selectable Marker and Reporter Genes for the Screening of Genetically Modified Crops / Randhawa GJ, Chhabra R, Singh M // J. Agric. Food Chem., 2009, v. 57, p. 5167-5172.

[5] Structure and expression of fatty acid desaturases / Los DA, Murata N // Biochimica et Biophysica Acta, 1998, v. 1394, p. 3-15.

[6] A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* / Piruzian ES, Goldenkova IV, et al. // Mol Genet Genomics, 2002, v. 266, p. 778-786.



Фіг. 1

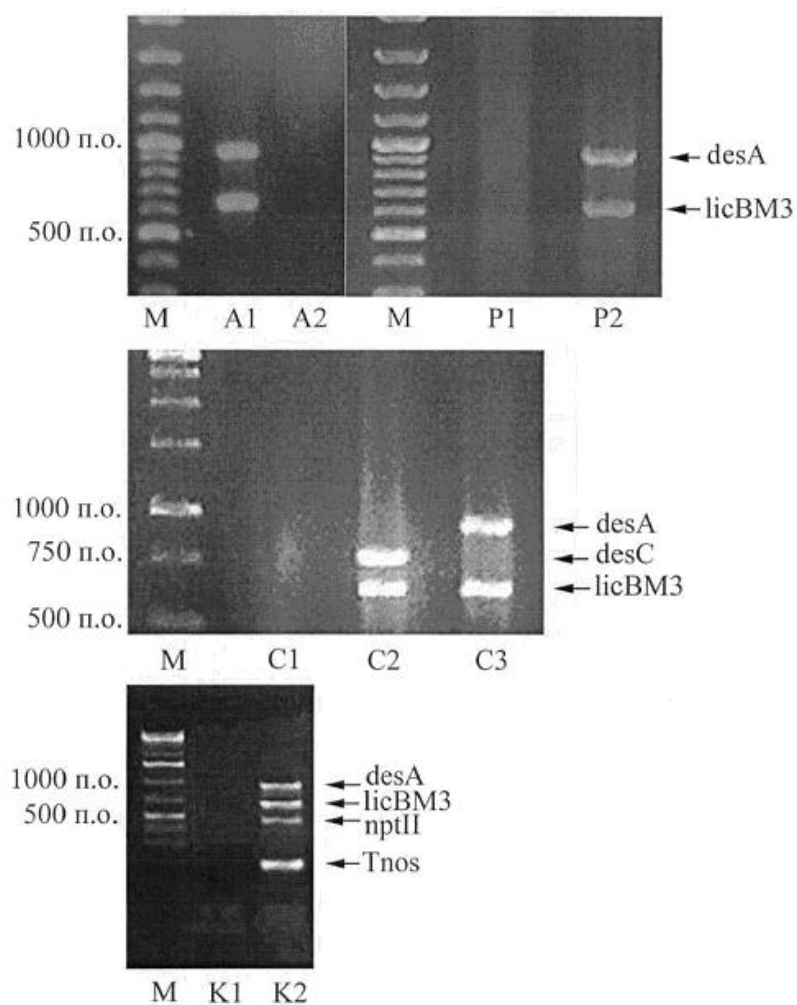


Fig. 2