

УДК 575:613.526.55

Ю. М. СИВОЛАП, Р. Н. КАЛЕНДАРЬ, С. В. ЧЕБОТАРЬ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЗЛАКОВЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ПОМОЩИ ПЦР С ПРОИЗВОЛЬНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ

Полимеразная цепная реакция амплификации ДНК с участием произвольных праймеров является новым направлением установления специфичности геномов. Исследовали в качестве праймеров последовательности нуклеотидов, показавших определенный полиморфизм в ПДРФ-анализе. Подобраны температурные условия и концентрация Mg^{2+} . Показан меж- и внутривидовой полиморфизм у важнейших злаков.

Введение. Развитие теории и разработка новых методов улучшения растений связаны с познанием организации и изменчивости генетического материала. Большое значение в этом плане имеет изучение интрамолекулярной гетерогенности и анализ полиморфизма ДНК. Высокий уровень полиморфизма обнаружен при гибридизации рестриktированной эндонуклеазами ДНК с определенными зондами — ПДРФ-анализ. Применяемые зонды можно условно разделить на две группы. К первой относятся последовательности с установленной локализацией и функцией. Информация об их изменчивости позволяет определить генетические дистанции между изучаемыми видами или формами и установить филогенетические взаимоотношения. Анализ изменчивости фрагментов ДНК с неустановленной функцией и расположением в геноме менее определен и сложен [1]. В то же время они находят применение в исследованиях вариабельности геномов высших организмов. При помощи последовательностей, кодирующих белок Π фага M13, обнаружен полиморфизм у линий *Arabidopsis* [2] и сортов яблони [3]

© Ю. М. СИВОЛАП, Р. Н. КАЛЕНДАРЬ, С. В. ЧЕБОТАРЬ, 1994

и др. Тандемные повторы GATA и GACA показали значительную гетерогенность компонентов и генотипическую специфичность при гибридизации с ДНК нута и ячменя [4]. 21-членный олигонуклеотид позволил выявить полиморфизм у винограда [5].

Новое направление методологии установления специфичности геномов открыто при помощи амплификации ДНК с олигонуклеотидными праймерами полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Вариабельность ДНК на уровне индивидуумов обнаружили Мензел и др. [6]. Подход, основанный на принципе ПЦР для отбора делеционных мутантов, применили Атрея и др. [7]. С помощью олигонуклеотидных праймеров, комплементарных участкам, фланкирующим тандемы, Дикорти и др. [8] осуществили идентификацию тандемных повторов с вариабельной копийностью (VNTR) и предложили использовать этот подход в качестве «фингерпринта» генома.

Одной из основных трудностей в использовании ПЦР для анализа изменчивости генома является необходимость получения информации о последовательности нуклеотидов генов или вариабельных фрагментов ДНК для подбора праймеров. Описана модификация ПЦР с использованием в качестве праймеров произвольно выбранных олигонуклеотидов [9, 10]. Авторы предложили детектировать полиморфизм при амплификации ДНК с короткими, произвольно подобранными последовательностями ДНК и использовать продукт реакции в качестве маркера при картировании.

Консервативные и вариабельные для данного вида микроорганизма продукты ПЦР при применении универсальных произвольных праймеров описали Булат и др. [11]. Вариабельность ряда генотипов из коллекции кукурузы при помощи анализа продуктов ПЦР с произвольными праймерами охарактеризовали Андерсен и др. [12].

Целью нашей работы было изучение возможности использования в качестве произвольных праймеров олигонуклеотидов, показывающих вариабельность при ПДРФ-анализе, подбор условий ПЦР и определение меж- и внутривидового полиморфизма у злаковых растений.

Материалы и методы. Исследованию подвергали линии кукурузы *Zea mays* - Од322 и О74/87, гибрид 074/84ХОд322; сорта пшеницы *Triticum aestivum* L. (ABD) - *Chinese spring*, Безостая 1, Обрий, Одесская полукарликовая; сорта ячменя *Hordeum vulgare* — Донецкий 4, Джау Кабутак; виды *Triticeae* - *Triticum durum* Desf. (A^bB), *Triticum palmovae* Ivanov (A^bB), *Aegilops caudata* L. (C), *Aegilops umbellulata* Zhuk. (C^u), *Aegilops crassa* Boiss. (DM^{cr}), *Aegilops ventricosa* Tausch. (DM^u), *Aegilops triuncialis* L. (CC^u), *Aegilops columnaris* Zhuk. (C^uM^c), *Aegilops triaristata* Willd. (CuM^l), *Aegilops biuncialis* Vis. (C^uM^b). Обозначения геномов приведены в соответствии с работой Огихара и др. [13].

Использовали dATP, dGTP, dCTP и dCTP фирмы «Pharmacia» (США), которые нейтрализовали 0,1 М раствором NaOH до pH 7,0. Трис-основание, ЭДТА-Na₃, KCl, H₃BO₃, легкое минеральное масло — Bajor F фирмы «Serva» (Германия); MgCl₂ получены из фирмы «Merck» (Германия); агароза, Tween-20 — фирмы «Sigma» (США); 10xTBE: 0,89 М трис-основание, 0,89М H₃BO₃, 20 мМ ЭДТА-Na₃; Taq-полимераза получена из НПК «Биотех» (Москва). Для амплификации ДНК применяли прибор Биотерм (модель 91). ДНК выделяли с помощью протеиназы K и SDS [14].

Олигонуклеотиды синтезировали на автоматическом ДНК-синтезаторе «Applied Biosystems 380B» фосфорамидитовым методом. Детрирование олигонуклеотидов осуществляли на OPC (Oligonucleotide Purification Cartridges) согласно инструкции к синтезатору. Очистку олигонуклеотидов проводили на FPLC на колонке Mono Q (LKB) с последующим обессоливанием образцов на колонке Amprep C₁₈ «Amersham» (Англия).

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 20 мкл содержала: 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,4 (25°C), 2-

5 мМ MgCl₂, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ каждого dNTP, 0,2 мкМ праймера, 20 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. В пробирки поверх реакционного раствора наслаивали 50 мкл минерального масла (Bajol F). Образцы выдерживали 2 мин при 94°C и 2 мин при 48-55°C (температура рассчитывалась конкретно для каждого праймера), а затем проводили 34 цикла амплификации в следующем режиме: 92°C - 2 мин, 48-57°C - 1 мин, 72°C - 2 мин. Последний цикл элонгации длился 5 мин. Реакцию останавливали, добавляя ЭДТА-Na₃ до 10 мМ. Продукты амплификации фракционировали электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с 1ХТВЕ.

Оптимальную температуру гибридизации праймеров с ДНК рассчитывали по формуле, предложенной Ричлик и др. [15]:

$$T_a^{opt} = 0,3T_m^{primer} + 0,7T_m^{product} - 14,9;$$

где T_a^{opt} — оптимальная температура гибридизации праймера с ДНК матрицы; T_m^{primer} — температура плавления праймера; $T_m^{product}$ — температура плавления продукта ПЦР.

Температуру плавления праймера в стандартных условиях вычисляли по формуле:

$$T_m^{primer} = -k \frac{dG}{l_0^{3,3/13}},$$

где $k = 2,913682$, если концентрация ионов калия в растворе равна 50 мМ, l_0 — длина олигонуклеотида в нуклеотидах.

Температуру плавления продукта определяли по формуле

$$T_m^{product} = 81,5 + 16,6[K^+] + 0,41(C + G\%) - 675/lp,$$

где $[K^+]$ — концентрация ионов калия, моль; $(G+C \%)$ — количество G и C в продукте ПЦР, %; lp — длина продукта, пары нуклеотидов.

Значения dG определены, исходя из данных Вэлша [16], для каждого из 10 возможных вариантов сочетания соседних пар нуклеотидов в олигонуклеотиде.

Результаты исследований и их обсуждение. Подбор условий реакции. Одним из важнейших аспектов реакции амплификации является подбор соответствующей температуры гибридизации праймера с ДНК (табл. 1). Оптимальной следует считать температуру, при которой образуется максимальное количество продукта ПЦР без появления неспецифических примесей. Оптимальная температура T_a^{opt} рассчитывается по формуле, в которую входит температура плавления праймера и продукта ПЦР. Конечный результат зависит на 70% от темпера-

Таблица 2
Диапазон температуры гибридизации (T_a^{opt}) праймеров с матричной ДНК в зависимости от размера продукта амплификации

Т а б л и ц а			Т а б л и ц а			
Праймеры, используемые в работе			Праймер	T_m^{opt} для синтезируемого продукта размером, н.п.		
Праймер	Последовательность 5'-3'	Температура плавления праймера °C		300	2000	300—2000
P1	CCATGGTACCCGGATCCTCG	57,8	P1	51-61	57-63	56-63
P2	GACAGACAGACAGACA	34,6	P2	49-54	50-56	49-56
P3	GATTTAGGTGACACTATAG	39,0	P3	50-56	51-57	50-57
P4	ATTAACCCCTCACTAAAGGGA	48,7	P4	53-59	54-60	53-60
P5	AGGTCTTAACTTGACTAACAT	43,8	P5	52-57	53-59	52-59
P6	GAGCAAGTTCAGCCTGG	46,6	P6	52-58	54-59	52-59
P7	TAATACGACTCACTATAGGG	43,7	P7	51-57	53-59	51-59

туры плавления продукта и на 30 % от температуры плавления праймера. Отклонение на 4 градуса в вычислении температуры плавления праймера приводит к изменению на один градус T_a^{opt} . Ошибка вычис-

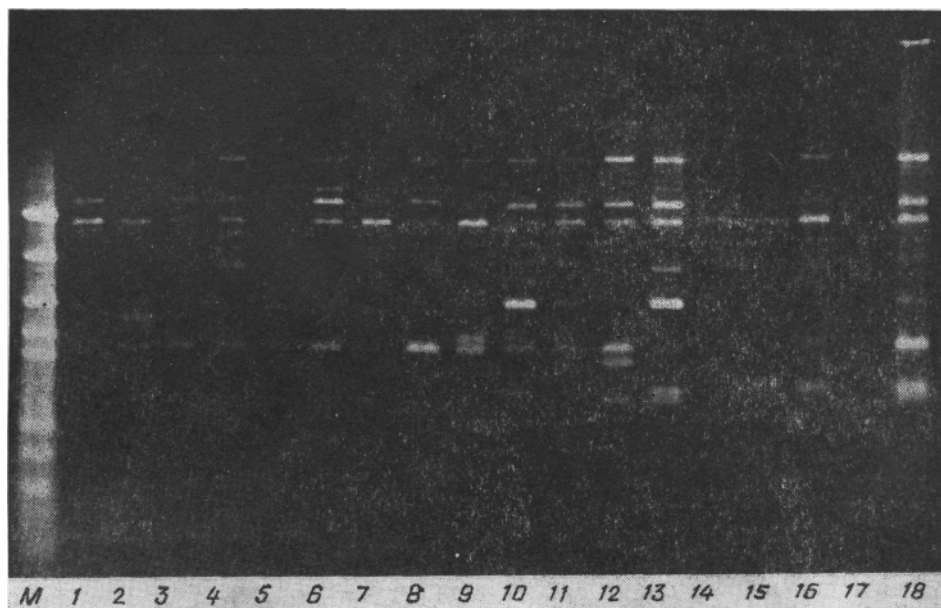


Рис. 1. Продукты ПЦР ДНК ячменя с праймером Р-7. В течение первого цикла ПЦР реассоциация праймера с матричной ДНК проводилась при комнатной температуре в течение 5 мин: М — маркер M13 mp8 по RsaI; 1—9 повторности амплификации ДНК ячменя сорта Донецкий 4; 10—18 повторности для ДНК ячменя сорта Джау Кабутак

ления T_a^{opt} на ± 3 градуса приводит к появлению неспецифического продукта и уменьшению выхода основного продукта.

Продукт амплификации ДНК с произвольным праймером не однотипен, могут образовываться молекулы с различной молекулярной массой и, возможно, СG-составом. Обычно размер продукта ПЦР располагается в диапазоне от 300 до 2000 пар нуклеотидов. При варьировании СG-состава в пределах 45—65 % изменение T_a^{opt} соответствует 7 градусам (табл. 2). Изменение

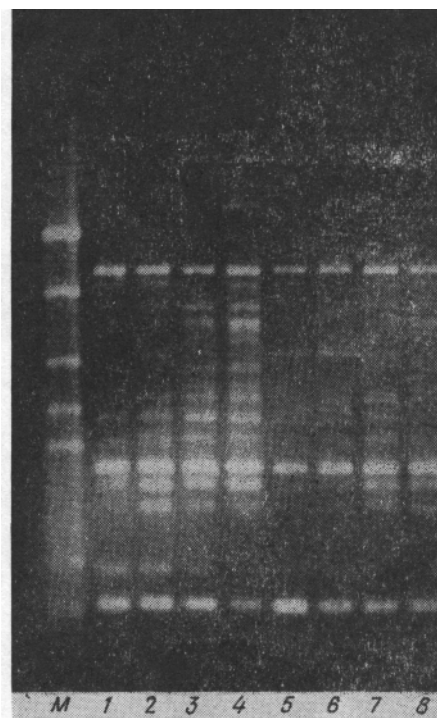


Рис. 2. Образцы амплификации ДНК пшеницы с праймером Р-5 при различных концентрациях $MgCl_2$: М — маркер M13 mp8 по RsaI; 1—4 — ДНК сорта *Chinese spring*; 2—5 — ДНК сорта *Chinese spring* с дополненной по 4-й хромосоме ячменя Betzes; 1, 5 — 2 мМ $MgCl_2$; 2, 6 — 2,5 мМ $MgCl_2$; 3, 7 — 3 мМ $MgCl_2$; 4, 8 — 3,5 мМ $MgCl_2$

температуры T_a^{opt} в зависимости от размера продукта в пределах 300—2000 п. н. составляет один градус (табл. 2).

Некоторые авторы [9] применяют в ПЦР с произвольными праймерами температуру гибридизации не выше 40 °С. При использовании

температуры ниже параметров, рассчитанных по формуле, результаты амплификации могут не воспроизводиться. Снижение температуры ассоциации праймера с ДНК до 25—30°C приводит к образованию неспецифических продуктов реакции, которые варьируют в повторных

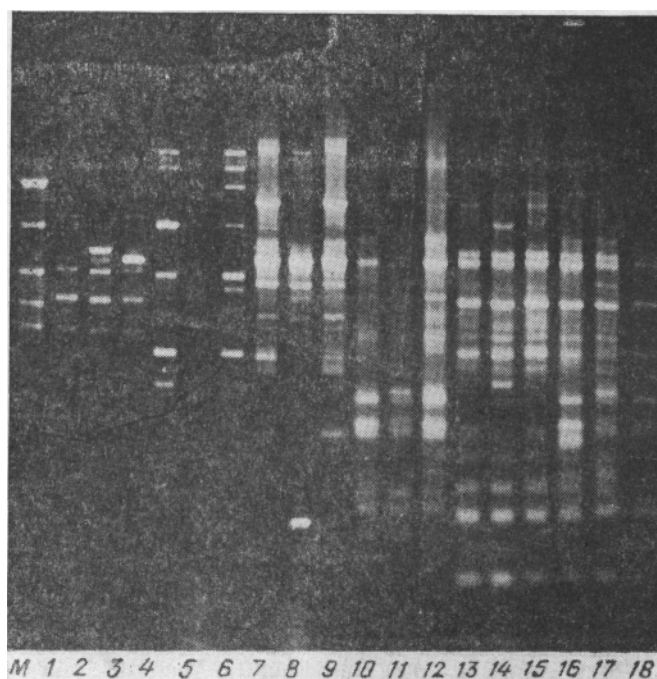
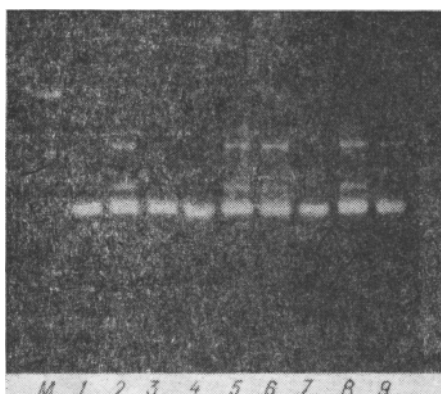


Рис. 3. Образцы амплификации ДНК кукурузы с различными праймерами: 1, 4, 7, 10, 13 — линия Одесская 322; 2, 5, 8, 11, 14, 17 — линия О74/84; 3, 6, 9, 12, 15, 18 — гибрид О74/84 х Одесская 322; 1-3 праймер Р6; 4-6 — праймер Р3; 7-9 — праймер Р5; 10-12 — праймеры Р6 и Р5; 13-15 — праймеры Р6 и Р3; 16-18 — праймеры Р6, Р3 и Р5

экспериментах. На рис. 1 представлены продукты амплификации ДНК двух сортов ячменя в условиях, когда ассоциация праймера с матричной ДНК происходила при комнатной температуре. В различных повторностях амплификации у обоих сортов после электрофоретического разделения детектируется неодинаковое количество полос.



В зависимости от степени комплементарности последовательностей праймера и матричной ДНК требуется различная концентрация

В зависимости от степени комплементарности последовательностей праймера и матричной ДНК требуется различная концентрация

Рис. 4. Продукты амплификации ДНК кукурузы с праймером Р-1 в трехкратной повторности: М — маркер (pBR 322 по *Hinf*I); 1, 4, 7 — линии Одесская 322; 2, 5, 8 — гибрид О74/84 х Одесская 322; 3, 6, 9 — линия О74/84

MgCl₂ [10]. Для амплификации в условиях не полностью комплементарных последовательностей праймера и матричной ДНК необходимо увеличивать концентрацию ионов магния. Это особенно важно в первых четырех циклах, в дальнейшем амплифицируются вновь синтезированные продукты, которые содержат концевые последовательности, полностью комплементарные праймеру.

Концентрация ионов магния свыше 1,5 мМ способствует в наших условиях повышению эффективности амплификации. На рис. 2 представлены результаты амплификации ДНК двух форм пшеницы с праймером P5, где использовали различную концентрацию $MgCl_2$. Отчетливые полосы на электрофореграммах детектируются при 2 мМ $MgCl_2$, и количество их увеличивается при повышении концентрации $MgCl_2$ до 3 - 3,5 мМ. Увеличение содержания $MgCl_2$ до 5 мМ приводит к уменьшению гетерогенности синтезируемого продукта (рисунок не приведен). Уровень гетерогенности синтезируемого продукта также зависит от применяемых праймеров и их количества. Линии кукурузы Од322 (1, 4, 7, 10, 13, 15 дорожки), О74/84 (2, 5, 8, 11, 14, 17 дорожки) и гибрид F_2 между ними О74/84Хх Од322 (3, 6, 9, 12, 15, 18 дорожки) (рис. 3) обнаруживают различное количество полос при амплификации с разными

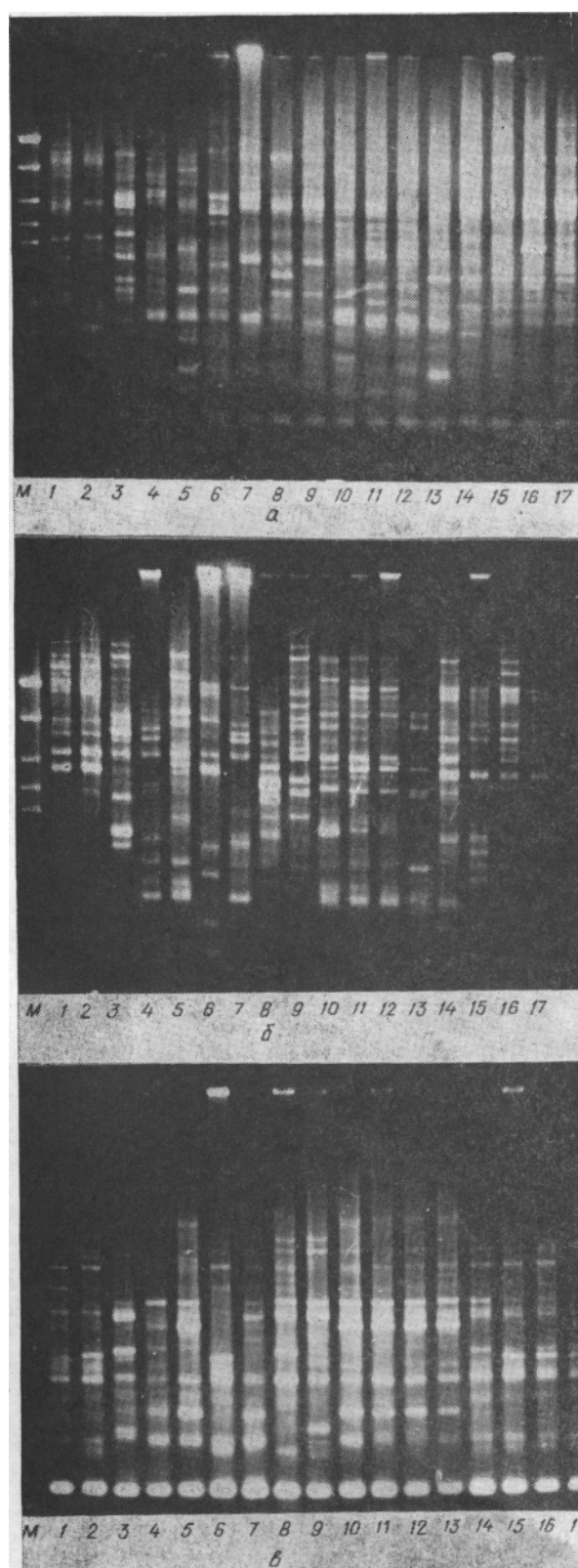


Рис. 5. Образцы ПЦР с различными праймерами ДНК видов *Triticeae* и сортов *Triticum aestivum*; а — праймер P-1; б — праймер P-1 и P-2; в — праймер P-5; М — маркер M13 гпр8 по RsaI; 1 — *T. monococcum*; 2 — *T. boeoticum*; 3 — *Ae. lauschnis*; 4 — *Ae. caudata*; 5 — *Ae. umbellulata*; 6 — *T. durum*; 7 — *Ae. cylindrica*; 8 — *Ac. crassa*; 9 — *Ae. ventricosa*; 10 — *Ae. triuncialis*; 11 — *Ae. columnaris*; 12 — *Ae. triaristata*; 13 — *Ae. biuncialis*; 14 — *T. palmovae*; 15 — *T. aestivum* Одесская полукарликовая; 16 — *T. aestivum* Обрий; 17 — *T. aestivum* Безостая I

праймерами. При использовании двух (10-15 дорожки) или трех (16-18 дорожки) праймеров детектируется большее количество полос. Отмечается синтез низкомолекулярных фрагментов, отсутствующих в реакциях с одним праймером.

Хорошо воспроизводимые результаты амплификации получаются при подборе температуры в соответствии с приведенными формулами и концентрацией $MgCl_2$, обеспечивающей отчетливые полосы продуктов ПЦР на электрофорезе. Воспроизводимость результатов амплификации ДНК кукурузы при температуре 52 °С и концентрации магния, равной 4 мМ, приведена на рис. 4.

Анализ полиморфизма ДНК. При электрофоретическом разделении продуктов амплификации ДНК различных видов проявляется межвидовой полиморфизм. Практически все применяемые нами

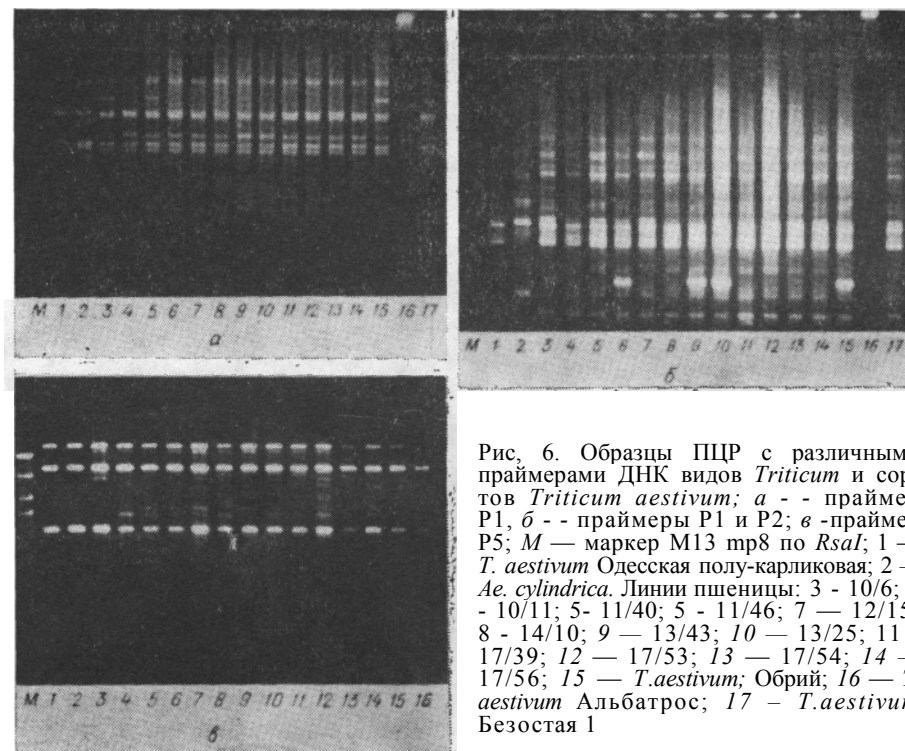


Рис. 6. Образцы ПЦР с различными праймерами ДНК видов *Triticum* и сортов *Triticum aestivum*; а - - праймер Р1, б - - праймеры Р1 и Р2; в - праймер Р5; М — маркер М13 mp8 по *RsaI*; 1 — *T. aestivum* Одесская полу-карликовая; 2 — *Ae. cylindrica*. Линии пшеницы: 3 - 10/6; 4 - 10/11; 5 - 11/40; 5 - 11/46; 7 — 12/15; 8 - 14/10; 9 — 13/43; 10 — 13/25; 11 - 17/39; 12 — 17/53; 13 — 17/54; 14 — 17/56; 15 — *T. aestivum*; Обрий; 16 — *T. aestivum* Альбатрос; 17 — *T. aestivum* Безостая 1

праймеры позволили получить специфические для анализируемых видов *Triticeae* образцы электрофоретического распределения (рис. 5). Характерно, что продукты амплификации, одинаковые по электрофоретической подвижности, отмечены у видов с близким геномным составом - *T. monococcum* (A) и *Ae. boeoticum* (A^b); *Ae. columnaris* (C^uM^b), *Ae. triuncialis* (CC^u) и *Ae. biuncialis* (C^uM^b). Спектры электрофореграмм *T. palmovae* (A^bD) и сортов *T. aestivum* имеют мало различий. Уровень внутривидового полиморфизма образцов ПЦР зависит от применяемого праймера. Использование праймера Р1 обнаруживает четыре, а Р1 и Р2 - три типа распределения продуктов амплификации среди 15 форм пшеницы (рис. 6, а, б). Специфические, свойственные каждой форме пшеницы спектры распределения продуктов, амплификации выявлены с праймером Р5 (рис. 6, в).

Выводы. Таким образом, на злаковых растениях продемонстрирован различный уровень меж- и внутривидовой специфичности образцов ПЦР и праймерспецифичность в ДНК гибридизации.

РЕЗЮМЕ. Полімеразна ланцюгова реакція ампліфікації ДНК з використанням випадкових праймерів — новий напрямок у встановленні специфічності геномів. Досліджували у якості праймерів послідовності нуклеотидів, що виявили певний поліморфізм у ПДРФ-аналізі. Підбрано температурний режим та концентрацію Mg^{2+} для встановлення між- та внутрішньовидового поліморфізму у найважливіших злаків.

SUMMARY. Polymerase chain reaction of DNA amplification with the use of random primers is a new approach in investigations of genome specificity. Nucleotide sequences that showed polymorphism in RFLP analysis were used as primers. Optimal

temperature conditions and Mg^{2+} concentrations were determined for studying inter- and intraspecific DNA polymorphism in the most important cereals.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lynch M. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting // Mol. Biol. Evol.-1988.—5, N 5.—P. 584—599.
2. Zimmerman P., A., Zang-Unnaseh N., Culiis C. A. Polymorphic regions in plant genomes detected by an M13 probe // Genome. —1989. —32, N 5. —P. 824—828.
3. Nibom H., Rogstad S. H., Shaal B. A. Genetic variation detected by use of M13 «fingerprint» probe in Malus, Primus and Rubus (Rosaceae) // Theor. and Appl. Genet.—1990.—79, N 2.—P. 153—156.
4. Weising K., Weigang P., Driesel A. et al. Polymorphic single GATA/GACA repeat in plant genomes // Nucl. Acids Res.—1989. —17, N 23. —P. 10—28.
5. Сиволан Ю. М., Вербицкая Т. Г., Прокопенко С. П., Тулаева М. И. Исследование внутривидового полиморфизма ДНК у винограда *Vitis vinifera* // Цитология и генетика.—1992.—26, № 3.—С. 11—15.
6. Menzel A., Zagoda P., Issenger O. G. Hyper-variable individual-specific DNA band patterns revealed by a 22-mer promoter specific oligonucleotide probe containing an SP1 site // Nucl. Acids Res.—1990. —18, N 14. —P. 4287.
7. Atreya C.f Atreya P., Pirone T. Selection of deletion mutants by polymerase chain reaction // Biochem. and Biophys. Res. Commun. —1990. —173, N 3. —P. 1344.
8. Decorte I. The polymerase chain reaction: a valuable method for retroviral detection // Lymphology. — 1990. — 23, N 2. —P. 92—97.
9. Williams Y. G.K., Kubelik A. R., Livak K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids. Res.— 1990. — 18, N 22. —P. 6531—6535.
10. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers// Nucl. Acids Res.—1990. —18, N 24. —P. 7213—7218.
11. Булат С.А., Кобаев О.К., МIRONENKO Н. Б. и др. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов // Генетика - 1992 - 28(5), С19-27.
12. Andersen W., Fairbanks D. Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization // Diversity. — 1990. — 6, N 3. — P. 51—53.
13. Ogihara Y., Tsunewaki K. Diversity and evolution of chloroplast DNA in Triticum and Aegilops as revealed by restriction fragment analysis // Theor. and Appl. Ge net.—1988.— 76, N 3.—P. 321—332.
14. Дрейнер Дж., Скотт З., Армитадж Ф. и др. Генная инженерия растений. - М. : Мир, 1994. - 407 с.
15. Rychlik W., Spencer W. Y., Rhoads R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // Nucl. Acids Res. - 1990. -18, N 21. -P. 6400.
16. Breslaer K., Frank R., Blacker H., Amarky L. Predicting DNA duplex stability from the base sequence // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. -1986. -83. -P. 3746-3750.