

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЭКОТИПОВ *Arabidopsis thaliana* С ПОМОЩЬЮ SSLP-МАРКЕРОВ

О. В. Зими́на¹
Е. С. Сыт́ник²
М. Ф. Па́рий²
Е. Г. Алхи́мова¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Киев

²Национальный университет биоресурсов и природопользования
НААН Украины, Киев

E-mail: come2olya@gmail.com

Получено 13.05.2014

Целью работы было, используя базу данных The Arabidopsis Information Resource, подобрать 12 SSLP-маркеров, распределенных по хромосомам и плечам хромосом арабидопсиса, оптимизировать условия амплификации каждого из фрагментов и одновременной амплификации нескольких фрагментов. Для идентификации экотипов *A. thaliana* и их гибрида в качестве ДНК-маркеров использовали последовательности SSLP, которые у арабидопсиса высокополиморфны и просты в применении. С помощью этой базы данных были подобраны праймеры для 12 SSLP-маркеров, распределенных по всем хромосомам и их плечам. Растительным материалом служили линии *A. thaliana* экотипов *Columbia* и *Landsberg erecta*. В результате проведенных экспериментов по оптимизации условий ПЦР было установлено, что двустадийная ПЦР с использованием двух температур отжига праймеров в каждом цикле позволяет эффективно амплифицировать все рассматриваемые в работе фрагменты. Определены условия для проведения двух ПЦР-мультиплексов, каждый из которых позволяет амплифицировать по два фрагмента, и одного ПЦР-мультиплекса — для амплификации трех маркеров. Разработанная система ДНК-маркеров может быть использована для изучения поведения и наследования каждой хромосомы материнского и отцовского геномов гибридов арабидопсиса, а также дает возможность быстро и эффективно проводить генетический анализ.

Ключевые слова: экотипы *Arabidopsis thaliana*, SSLP-маркеры, ПЦР-мультиплекс.

В настоящее время разработаны многочисленные методы изучения различных организмов на уровне последовательностей ДНК, что позволяет проводить масштабные исследования организации их геномов, изменчивости и стабильности, биоразнообразия, эволюционного развития и т. п. Совокупность подходов и методов под общим названием «ДНК-маркирование» дает возможность выявлять отличия в первичной структуре ДНК [1]. Разновидностью часто используемых ДНК-маркеров являются последовательности микросателлитов — некодирующих участков ДНК, состоящих из tandemно расположенных, многократно повторяющихся коротких (от одного до шести пар нуклеотидов) мотивов. Различные организмы, экотипы, формы и виды имеют разное количество таких повторяющихся элементов ДНК в данном локусе. Полиморфные локусы с аллелями разной длины (в зависимости от количества повторов) позволяют

легко идентифицировать тот или иной генотип путем амплификации микросателлитного фрагмента в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим определением его размера.

В исследованиях, посвященных процессам изменчивости генома у *A. thaliana*, мы использовали маркеры SSLP (Simple sequence length polymorphism). Эти микросателлитные маркеры имеют кодоминантный тип наследования, просты в применении, требуют минимум затрат реактивов и времени и весьма информативны [2, 3]. Одна из задач наших исследований — изучение явления соматической сегрегации хромосом, особого типа деления соматических клеток, при котором возможно мейозоподобное распределение хромосом между дочерними клетками, что может приводить к гаплоидизации и гомозиготации [4–6]. Для изучения поведения и наследования хромосом материнского и отцовского геномов при индуциро-

вании соматической сегрегации был создан гибрид *A. thaliana* между экотипами *Columbia* и *Landsberg erecta*, хромосомы которых легко идентифицировать с помощью ДНК-маркеров [7]. У арабидопсиса описаны более 50 кодоминантных SSLP-маркеров [8, 9]. Bell и Ecker продемонстрировали на шести экотипах, в том числе на *Columbia* и *Landsberg erecta*, что эти микросателлиты у арабидопсиса достаточно высокополиморфны и подходят для идентификации генотипов [8].

Целью работы было, используя базу данных TAIR, подобрать 12 SSLP-маркеров, распределенных по хромосомам и плечам хромосом арабидопсиса, оптимизировать условия амплификации каждого из фрагментов и для одновременной амплификации нескольких фрагментов — мультиплексных ПЦР, а также разработать один ПЦР-мультиплекс для трех маркеров и два мультиплекса, каждый из которых позволяет амплифицировать по два фрагмента.

Материалы и методы

Растительный материал и создание гибрида. Для эксперимента использовали линии *A. thaliana* экотипов *Columbia* (№1093, NASC) и *Landsberg erecta* (№1298, NASC). Перед посевом с целью выравнивания темпов развития проростков проводили яровизацию семян на протяжении 2 сут при температуре 4–6 °С. Затем проростки выращивали в условиях закрытого грунта (рН 5,6–5,8) и 16-часового светового периода. С помощью бинокулярного микроскопа осуществляли кастрацию и принудительную гибридизацию растений арабидопсиса.

Подбор ДНК-маркеров проводили с помощью поискового ресурса веб-сайта TAIR таким образом, чтобы на каждом плече с 1-й по 4-ю хромосому находилось по одному маркеру и на обоих плечах 5-й хромосомы — по два маркера. Разница длин фрагментов разных локусов составляет от 15 п. н. и выше, что позволяет легко отличать эти фрагменты в 4% -м агарозном геле. Последовательности праймеров представлены в таблице.

Выделение ДНК и условия ПЦР. Геномную ДНК выделяли из листьев растений по методу СТАБ [10]. Качество и концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра SPECTRAMax PLUS384. Смесь ПЦР на одну реакцию (15 µl) содержала: 1,5 µl 10x реакционного буфера (SibEnzyme), 2,5 mM MgCl₂, 0,4 µM каждого праймера, смесь dNTPs (250 µM каждого), 0,2 U Taq-полимеразы (SibEnzyme) и 30–40 нг

геномной ДНК. Температуру отжига устанавливали экспериментальным путем для каждой пары праймеров в отдельности, а затем в мультиплексной комбинации. Ориентировочную температуру отжига определяли по формуле:

$$T_m (°C) = 4(G + C) + 2(A + T) - 5,$$

где G, C, A и T — количество соответствующих нуклеотидов в последовательности праймера.

Термоцикл реакции стартовал с начальной денатурации в течение 4 мин при 94 °С, затем следовали 35 циклов амплификации (30 с — 94 °С, 30 с — 45 °С, 30 с — 60 °С, 2 мин — 72 °С), финальная инкубация составляла 5 мин при 72 °С.

Электрофорез проводили по стандартной процедуре в 4% -м агарозном геле в нескольких повторениях [11].

Результаты и обсуждение

Для изучения соматической сегрегации хромосом было важно проследить наследование каждой хромосомы отцовского и материнского геномов гибрида арабидопсиса. Поэтому мы выбрали SSLP-маркеры таким образом, чтоб они располагались на каждом плече каждой хромосомы. Для 5-й хромосомы было выбрано по два маркера на каждое плечо. Информацию о последовательностях праймеров, размерах фрагментов и их локализации получили из данных, опубликованных в [8] и базы данных TAIR.

Функция «карта хромосомы» доступна в базе данных TAIR (<http://www.Arabidopsis.org/JSP/ChromosomeMap/tool.jsp>) и была использована для сопоставления физического расположения полиморфных маркеров данных экотипов (рис. 1).

Поскольку частота соматической сегрегации в наших предварительных экспериментах составляла 1–3% [12], для выявления феномена необходим анализ значительного количества растений. Следовательно, оптимизация проведения анализа с целью уменьшения затрат времени и средств в данном случае имела важное значение. В связи с этим были предприняты эксперименты по разработке мультиплексной ПЦР, позволяющей проводить генотипирование нескольких локусов одновременно в одной реакции ПЦР. Для решения этих задач было необходимо: 1) подобрать комбинации микросателлитных маркеров разных локусов с неодинаковой длиной фрагментов, что позволит четко отличать эти фрагменты при проведении электрофореза в агарозном геле;

ДНК-маркеры и праймеры, использованные для ПЦР-реакций

№	Микросателлит	Хромосома	Последовательность 5' → 3' forward, reverse	Размер ПЦР-продукта (п. н.)	
				Col	Ler
1	F16J7-TRB	1	F: -TGATGTTGAGATCTGTGTGCAG- R: -GTGTCTTGATACGCGTCGAT-	165	114
2	NGA280	1	F: -GGCTCCATAAAAAGTGCACC- R: -CTGATCTCACGGACAATAGTGC-	105	85
3	CIW2	2	F: -CCCAAAAGTTAATTATACTGT- R: -CCGGGTTAATAATAAATGT-	105	90
4	NGA168	2	F: -GAGGACATGTATAGGAGCCTC- R: -TCGTCTACTGCACTGCCG-	151	135
5	ATDMC1.1	3	F: -GCAACTGAATTTGTTTTCGTTTG- R: -TTGATTAGTGGATCCGCAAACAA-	2200	342
6	CIW4	3	F: -GTTTCATTAACCTTGCCTGTGT- R: -TACGGTCAGATTGAGTGATTC-	190	215
7	CIW5	4	F: -GGTTAAAAATTAGGGTTACGA- R: -AGATTTACGTGGAAGCAAT-	164	144
8	CIW6	4	F: -CTCGTAGTGCACTTTCATCA- R: -CACATGGTTAGGGAAACAATA-	155	150
9	NGA151	5	F: -CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG- R: -GTTTTGGGAAGTTTTGCTGG-	150	120
10	NGA106	5	F: -TGCCCCATTTTGTCTTCTC- R: -GTTATGGAGTTTCTAGGGCACG-	157	123
11	PHYC.3	5	F: -AAACTCGAGAGTTTTGTCTAGATC- R: -TCAGAGAATTCAGAAAAAATCT-	207	222
12	CIW9	5	F: -CAGACGTATCAAATGACAAAATG- R: -GACTACTGCTCAAACATATTCGG-	165	145

Здесь и далее — результаты типичного эксперимента.

2) подобрать температуру отжига праймеров, при которой в ходе амплификации происходил бы синтез максимального количества хорошо различимых фрагментов. Расчетные значения температур отжига существенно различались для разных праймеров и их комбинаций: от 50 °C до 68 °C. В начале мы проводили ПЦР для каждого локуса в отдельной пробирке, используя термоцикл с одним из средних значений температур: 50 °C, 55 °C, 60 °C. Однако при таком режиме не все фрагменты амплифицировались, набавывалось много неспецифичных продуктов, картина на электрофореграмме была нечеткой. В результате проведенных экспериментов по подбору условий ПЦР было установлено, что двустадийная ПЦР с использованием двух температур отжига праймеров в каждом цикле — 45 °C и 60 °C — позволяет эффективно амплифицировать все используемые фрагменты. Поскольку разница в размерах фрагментов ДНК составляла не менее 15 п. н., электрофорез продуктов амплификации в 4%-м агарозном геле позволял четко их различать. Результаты амплификации и разделения фрагментов в геле приведены на рис. 2.

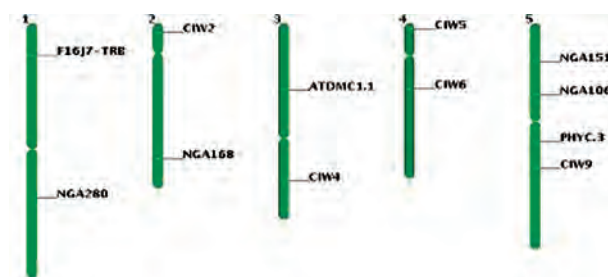


Рис. 1. Генетическая карта, показывающая позиции микросателлитов на хромосомах *Arabidopsis thaliana*

Размеры амплифицированных фрагментов для каждого из маркеров соответствовали ожидаемым (таблица). В мультиплексной реакции для 1-го (F16J7-TRB) и 2-го (NGA280) маркеров образуются фрагменты длиной 165 и 114 п. н. соответственно в случае экотипа *Columbia* (A) и длиной 105 и 85 п. н. — *Landsberg erecta* (B). В геномной ДНК гибрида присутствуют все четыре фрагмента. Аналогичная картина наблюдается и для остальных мультиплексов (таблица; рис. 2). Для одного из микросателлитов (5-й маркер, ATDMC1.1) как в экотипе *Columbia*,

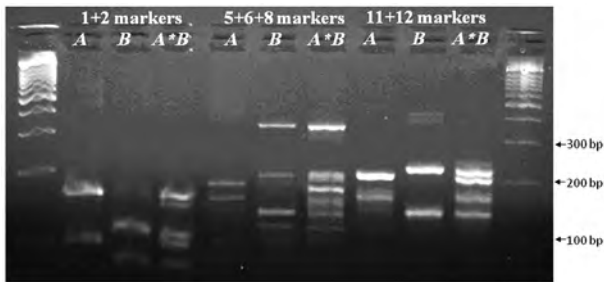


Рис. 2. Электрофореграмма мультиплексной ПЦР SSLP-маркеров для двух экотипов *A. thaliana*, *Columbia* (A) и *Landsberg erecta* (B), а также их гибрида (A*B):

1+2 markers — мультиплекс ПЦР со смесью праймеров F16J7-TRB и NGA280; 5+6+8 markers — смесь праймеров ATDMC1.1, CIW4 и CIW6; 11+12 markers — смесь праймеров PHYC.3 и CIW9

так и в гибриде не амплифицируется фрагмент размером 2,2 тыс. п. н. (рис. 2), что может быть связано с делецией в данном экотипе. В дальнейшем предполагается использование этого маркера в качестве ноль-аллеля.

REFERENCES

1. Sahu B. B., Sumit R., Srivastava S. K., Bhattacharyya M. D. Sequence based polymorphic (SBP) marker technology for targeted genomic regions: its application in generating a molecular map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics*. 2012, 13(20), 1–10. doi:10.1186/1471-2164-13-20.
2. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 1989, 17(16), 6463–6471.
3. Rosenberg N. A., Pritchard J. K., Weber J. L., Cann H. M., Kidd K. K., Zhivotovsky L. A., Feldman M. W. Genetic structure of human populations. *Science*. 2002, 298(5602), 2381–2385.
4. Sytnyk K., Zimina O., Vdovychenko Zh., Spyrydonov V., Parii M. Somatic Segregation: Genetic Evidences, Consequences and Applications. *Acta Horticulturae* 961. 2012, 1(77), 495–502.
5. Giorgetti L., Vergara M. R., Evangelista M., Terzi M., Ronchi V. N. On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. *Mol. Gen. Genet.* 1995, 246(6), 657–662.
6. Sybenga. J. Somatic segregation in rice. *Genome*. 2000, 43(4), 720–722.
7. Zimina O. V., Sytnyk E. S., Vdovychenko Zh. V., Alkhimova O. G., Spyrydonov V. G., Parii M. F. Creation of *Arabidopsis thaliana* transgenic lines for study chromosome segregation phenomenon. *Voprosi eksperimentalnoy evolyutsii organizmov*. 2011, V. 11, P. 263–268. (In Russian).
8. Bell C. J., Ecker J. R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*. 1994, 19 (1), 137–144.
9. Ponce M. R., Robles P., Micol J. L. High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 1999, 261(2), 408–415.
10. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, V. 19, P. 11–15.
11. Maniatis T. E., Fritsch F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory Manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1982, P. 202–203.
12. Zimina O. V., Sytnyk E. S., Parii M. F., Alkhimova O. G. Study of somatic segregation in *Arabidopsis* cells cultured in vitro. *Biopolymers and Cell: Materials 5th Conference IMBG Young Scientists*. Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics. 2011, 327 p.

Таким образом, нами были разработаны мультиплексные реакции для семи маркеров: две для двух маркеров каждая (F16J7-TRB+NGA280; PHYC.3+ CIW9) и одна — для трех (ATDMC1.1+CIW4+CIW6) (рис. 2). Эта система мультиплексов позволит минимизировать количество используемых реактивов, информационно-ценных полос при анализе в агарозном геле, необходимых для визуализации продуктов ПЦР, а также сократить время исследований. Результаты работы дадут возможность быстрее и экономнее проводить массовые генотипирования растений арабидопсиса, экотипов *Columbia* и *Landsberg erecta*. Подобраны 12 SSLP маркеров для идентификации экотипов *Arabidopsis thaliana: Columbia* и *Landsberg erecta*, оптимизированы условия ПЦР-реакции для этих 12 микросателлитов и разработаны мультиплекс-реакции для идентификации 7 локусов. Разработанная система ДНК-маркеров может быть использована для исследования поведения и наследования хромосом материнского и отцовского геномов гибрида арабидопсиса.

**МУЛЬТИПЛЕКСНА ПОЛІМЕРАЗНА
ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ
ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ЕКОТИПІВ
Arabidopsis thaliana
ЗА ДОПОМОГОЮ SSLP-МАРКЕРІВ**

O. B. Зіміна¹
K. C. Ситник²
M. Ф. Парій²
O. Г. Алхімова¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ

²Національний університет біоресурсів
та природокористування НААН України,
Київ

E-mail: come2olya@gmail.com

Метою роботи було, використовуючи базу даних The Arabidopsis Information Resource, підібрати 12 SSLP-маркерів, розподілених за хромосомами і плечами хромосом арабідопсису, оптимізувати умови ампліфікації кожного з фрагментів і одночасної ампліфікації декількох фрагментів. Для ідентифікації екотипів *A. thaliana* та їхнього гібрида як ДНК-маркери використовували послідовності SSLP, що є високополіморфними в арабідопсису і простими у застосуванні. За допомогою цієї бази даних було підбрано праймери для 12 SSLP-маркерів, розподілених за всіма хромосомами та їхніми плечами. Рослинним матеріалом слугували лінії *A. thaliana* екотипів *Columbia* і *Landsberg erecta*. В результаті проведених експериментів з оптимізації умов ПЛР було встановлено, що двостадійна ПЛР з використанням двох температур відпалу праймерів в кожному циклі дає змогу ефективно ампліфікувати всі розглянуті в роботі фрагменти. Визначено умови для проведення двох ПЛР-мультиплексів, кожен з яких уможливорює ампліфікацію двох фрагментів, та одного ПЛР-мультиплексу — для ампліфікації трьох маркерів. Розроблена система ДНК-маркерів може бути використана для дослідження поведінки й успадкування кожної хромосоми материнського і батьківського геномів гібридів арабідопсису, а також дає можливість швидко та ефективно проводити генетичний аналіз.

Ключові слова: екотипи *Arabidopsis thaliana*, SSLP-маркери, ПЛР-мультиплекс.

**MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN
REACTION FOR GENOTYPING
OF *Arabidopsis thaliana* ECOTYPES
USING SSLP MARKERS**

O. V. Zimina¹
K. S. Sytnyk²
M. F. Parii²
O. G. Alkhimova¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²National University of Life and Environmental
Sciences of the National Academy of Agrarian
Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: come2olya@gmail.com

The goal of the work was, using the database «The Arabidopsis Information Resource» TAIR, to select 12 SSLP-markers distributed along the Arabidopsis chromosomes and chromosome arms, to optimize the conditions of amplification of each fragment and for simultaneous amplification of several fragments. For identification of *A. thaliana* ecotypes and their hybrid, the SSLP sequences were used. These DNA markers are highly polymorphic in Arabidopsis and easy to use. Using this database, the primers were selected for 12 SSLP-markers distributed along all chromosomes and their arms. *A. thaliana* ecotypes *Columbia* and *Landsberg erecta* were used. The experiments revealed that two-stage PCR using two annealing temperatures of primers in each cycle allows efficient amplification of all the fragments considered. The conditions for carrying out two multiplex PCR, each of which allows the two fragments were amplified and a single multiplex PCR allowing three markers for amplification were defined. The developed system of DNA markers can be used to study the behavior and inheritance of each chromosome of maternal and paternal genomes of Arabidopsis hybrids and enables quick and efficient genetic analysis.

Key words: *Arabidopsis thaliana* ecotypes, SSLP markers, multiplex PCR.