

## Литература

1. Кинцурашвили Д.Ф., Пруидзе Г.Н., Дурмишидзе С.В. Внутриклеточная локализация цитохромоксидазы и пероксидазы в листьях виноградной лозы // Изв. АН Груз. ССР. Сер. Б. – 1980. – Т. 6, №11. – С. 45-56.
2. Конарев В.Г., Тютюрев С.Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений // Научные труды ВИР. – Л: Колос, 1970. – 202 с.
3. Ракитин Ю.В. Гидразид малеиновой кислоты как регулятор роста растений // М.: Наука, 1973. – 367 с.
4. Mammadova A.D. Nuclear-mitochondrial interaction of cells genetic systems, under the stimulation of the growth processes by maleic acid hydrazide // Scientific enquiry in the contemporary world: theoretical basics and innovative approach», Research articles, Publishing Titusville, FL, USA. 2012. – P. 99-100.

## MAMMADOVA A.D.

Genetic Resources Institute of the Azerbaijan National Academy of Sciences  
Azerbaijan, AZ 1106, Baku, Azadlig Avenue, 155, e-mail: afet.m@mail.

## INTENSITY OF SYNTHESIS OF THE NUCLEIC ACIDS IN THE CYTOPLASMIC ORGANELLES OF PLANTS IN HETEROSIS AND STIMULATION OF THE GROWTH PROCESSES BY THE INFLUENCE OF MALEIC HYDRAZIDE

**Aims.** The study of changes in the content of nucleic acids in the mitochondria and chloroplasts of heterotic plants and stimulation of growth processes by the influence of maleic hydrazide. **Methods.** Mitochondria and chloroplasts were isolated by the differential centrifugation. Nucleic acids content in the mitochondria and chloroplasts were determined by the method described in the works of V.G. Konareva and S.L. Tyutereva (1970). **Results.** High content of mitochondrial RNA and DNA, as well as DNA of chloroplasts was observed in the wheat hybrids in comparison with their parental species. Activation of growth processes under the concentration of maleic hydrazide was accompanied by the activation of RNA and DNA in mitochondria of rye and wheat. **Conclusions.** Heterosis and stimulation of growth processes by the maleic hydrazide are accompanied by the intensification of the genetic apparatus of mitochondria.

**Key words:** Heterosis, stimulation of growth processes, maleic acid hydrazide, cytoplasmic organelles, nucleic acids.

## МАРКОВСЬКИЙ О.В., БАННИКОВА М.О., МОРГУН Б.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

## ВИЯВЛЕННЯ *CRU* ГЕНІВ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ СТІЙКІСТЬ ДО КОМАХ, ЗА ДОПОМОГОЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У ТРАНСГЕННОЇ КУКУРУДЗИ

Для швидкої та надійної детекції досліджуваних генів, які детермінують стійкість до комах (*cru* гени) було розроблено і оптимізовано методику проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (мПЛР). Ця технологія дозволяє проводити ампліфікацію в одній реакції декількох досліджуваних ділянок ДНК характерної довжини [1]. Розроблена методика передбачає використання двох (або більше) пар

олігонуклеотидних праймерів, специфічних до трансформаційних подій та однієї пари праймерів, специфічної до референтного гену кукурудзи – *zein* [1] або *adh1*. мПЛР було розроблено для проведення масового аналізу експериментальних зразків кукурудзи, зменшуючи затрати часу та реактивів. Досліджувані нами *cru* гени входять до складу трансформаційних подій кукурудзи (табл. 1).

### Матеріали і методи

**Рослинний матеріал.** У роботі досліджували експериментальні селекційні зразки кукурудзи НВФГ компанії «Маїс» та референтні зразки, які містили відповідні трансформаційні події.

**Виділення та очищення ДНК.** Загальну ДНК виділяли з паростків кукурудзи. Виділення та очищення ДНК проводилось ЦТАБ методом за [2-4]. Для перевірки наявності та якості загальної рослинної ДНК після процедури

виділення застосовувався метод електрофорезу нуклеїнових кислот в агарозному гелі [2]. Далі проводили спектрофотометричне вимірювання концентрації ДНК та стандартизацію зразків (30 нг/мкл).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за [1].

Електрофорез продуктів ампліфікації.

Електрофорез 12 мкл кожного зразка після мПЛР проводили в агарозному гелі (1,2%). В якості маркера використовували 400 нг маркера молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Умови проведення електрофорезу для всіх трансформаційних подій: напруга – 3,5 В/см; тривалість – 1,5 години.

Таблиця 1. Перелік праймерів, температур їх плавлення та температур віджигу

Ген	Трансформаційна подія	Праймер	T <sub>m</sub> , °C	Температура віджигу, °C	Розмір амплікону	Специфічність
<i>adh1</i>		Adh-F3	66	55	231	До гену
		Adh-R1	60			
<i>cryIA(b)</i>	Bt176	PEPC-C-20	60	56	186	До К
		CRY04	63			
	MON810	mg1	66	59	401	До К
		mg2	64			
		VM01	65	59	170	До ТП
		VM03	64			
<i>cryIF</i>	DAS1507	TC1507 01-5	61	56	103	До К
		TC1507 01-3	61			
		TC1507-1F	58	52	279	До ТП
		TC1507-2R	57			
<i>cry34Ab1</i> <i>cry35Ab1</i>	DAS59122	59F1	67	60	148	До К
		59R1	65			
		SEQ ID NO 9	69	57	313	До гену
		SEQ ID NO 10	63			
<i>cry3Bb1</i>	MON88017	M7F8	67	60	313	До гену
		M7R8	65			
		MON88017-mF	58	53	150	До ТП
		MON88017-mR	61			
<i>mcry3A</i>	MIR604	M6F1	67	62	268	До гену
		M6R1	67			
		E-604-F	60	55	133	До ТП
		E-604-R	65			

Примітки: T<sub>m</sub> – температура плавлення; «До ТП» – до трансформаційної події; «До К» – до генетичної конструкції, якою було здійснено генетичну трансформацію кукурудзи.

### Результати та обговорення

На відміну від більшості лабораторій, при аналізі зразків на наявність трансгенів детектували не наявність 35S промотора або NOS термінатора, а наявність послідовності самих генів. Тому був проведений добір та дизайн специфічних праймерів конкретно для кожного гена/трансформаційної події (таблиці 1, 2) [5, 6]. Для скорочення часу проведення ПЛР реакцій була розроблена мультиплексна ПЛР – одночасно визначали наявність декількох генетичних послідовностей.

Для виявлення трансформаційних подій готували реакційні суміші об'ємом 20 мкл, до

складу яких входи 1 × DreamTaq™ Green буфер (Thermo Scientific), 200 мкМ дНТФ, 0,5 одиниці DreamTaq™ полімерази, 30 нг зразку рослинної ДНК та праймери до референтного гену (*adh1*) і відповідної трансформаційної події (таблиця 2):

– для **Bt176** (ген *cryIA(b)/int.9* PEPC) 0,35 мкМ праймеру PEPC-C-20, 0,35 мкМ праймеру CRY04, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;

– для MON810 (ген *cryIA(b)* з інтроном *int.hsp70*) 0,45 мкМ праймеру mg1, 0,45 мкМ праймеру mg2, 0,25 мкМ праймеру VM01, 0,25 мкМ праймеру VM03, 0,2 мкМ праймеру ADH

F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;  
 – для **MON88017** (ген *cry3Bb1*) 0,45 мкМ праймеру M7F8, 0,45 мкМ праймеру M7R8, 0,45 мкМ праймеру MON88017-mF, 0,45 мкМ праймеру MON88017-mR, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;  
 – для **DAS1507** (ген *cry1F*) 0,5 мкМ праймеру TC1507 01-5, 0,5 мкМ праймеру TC1507 01-3, 0,5 мкМ праймеру TC1507-1F, 0,5 мкМ праймеру TC1507-2R, 0,15 мкМ праймеру ADH F3, 0,15 мкМ праймеру ADH R1;  
 – для **DAS59122** (гени *cry34Ab1*, *cry35Ab1*) 0,45 мкМ праймеру 59F1, 0,45 мкМ праймеру 59R1, 0,45 мкМ праймеру SEQ ID NO 9, 0,45 мкМ праймеру SEQ ID NO 10, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;  
 – для **MIR604** (ген *mtcry3A*) 0,35 мкМ праймеру M6F1 01-5, 0,35 мкМ праймеру M6R1

01-3, 0,5 мкМ праймеру E-604-F, 0,5 мкМ праймеру E-604-R, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1.

У всіх випадках негативним контролем слугувала реакційна суміш з 1 мкл ТЕ буфера рН 8,0 замість зразку ДНК.

**Методика мПЛР** на наявність трансформаційних подій Bt176, MON810, MON88017, DAS1507, MIR604, DAS59122 була наступною: денатурація рослинної ДНК – 4 хв при 94 °С; проводили 35 циклів, кожен з яких включає денатурацію ДНК – 30 сек при 94 °С. Час і температуру ренатурації ДНК з олігонуклеотидними праймерами та синтезу фрагментів цільових генів для кожної трансформаційної події підбирали індивідуально:

Таблиця 2. Нуклеотидні послідовності праймерів

Трансформаційна подія	Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність праймеру
Референтний ген <i>adh1</i>	Adh-F3	CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC
	Adh-R1	GACAGAGGAGAAACAAGGCG
Bt176	PEPC-C-20	ATC TCG CTT CCG TGC TTA GC
	CRY04	GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT
MON810	mg1	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC
	mg2	TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT
	VM01	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG
	VM03	TCCATCTTTGGGACCACTGTTCG
MON88017	M7F8	CGCCAAGTCCAAGGCCCTGG
	M7R8	CGCCAAGTCCAAGGCCCTGG
	MON88017-mF	ATCGTGTGACAACGCTAGCA
	MON88017-mR	CATATTGACCATCATACTCATTGCT
DAS1507	TC1507 01-5	GCTTCAACAGGGCTGAGTTTG
	TC1507 01-3	CCCCACACAGTTTGGGATCTA
	TC1507-1F	CTTGTGGTGTTTGTGGCTCT
	TC1507-2R	TGGCTCCTCCTTCGTATGT
DAS59122	59F1	GCACCTCCCCGACCAACGTG
	59R1	CCGGCGAACGGGTTGTGCGAA
	SEQ ID NO 9	CTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTGTCAG
	SEQ ID NO 10	TTTTGCAAAGCGAACGATTCAGATG
MIR604	M6F1	CGCCATCAGCGGCTACGAGG
	M6R1	GGTCATCTCGCGGCGGTAGC
	E-604-F	TGGACGCCAGATCACACATG
	E-604-R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT

Bt176 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 56 °С, синтез фрагментів цільових генів – 18 сек при 72 °С.

MON810 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 59 °С, синтез фрагментів цільових генів – 27 сек при 72 °С.

MON88017 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 53 °С, синтез фрагментів цільових генів – 22 сек при 72 °С.

DAS1507 – ренатурацію ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 52 °С, синтез фрагментів цільових генів – 20 сек при 72 °С.

DAS59122 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 57 °С, синтез фрагментів цільових генів – 22 сек при 72 °С.

MIR604 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 55 °С, синтез фрагментів цільових генів – 19 сек при 72 °С.

Кінцевий синтез фрагментів цільових генів у всіх реакціях проводили 10 хв при 72 °С.

Продукти мПЛР являли собою фрагмен-

ти референтного гену кукурудзи *adh1* розміром 231 п.о. та цільові фрагменти ДНК *cry* генів/трансформаційних подій/генетичних конструкцій, які мають характерну довжину (табл. 1, рис.).

«ДЗ» – досліджуваний зразок, «РЗ» – референтний зразок, «К-» – негативний контроль – реакційна суміш з 1 мкл ТЕ буфера рН 8,0 замість зразку ДНК, «М» – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

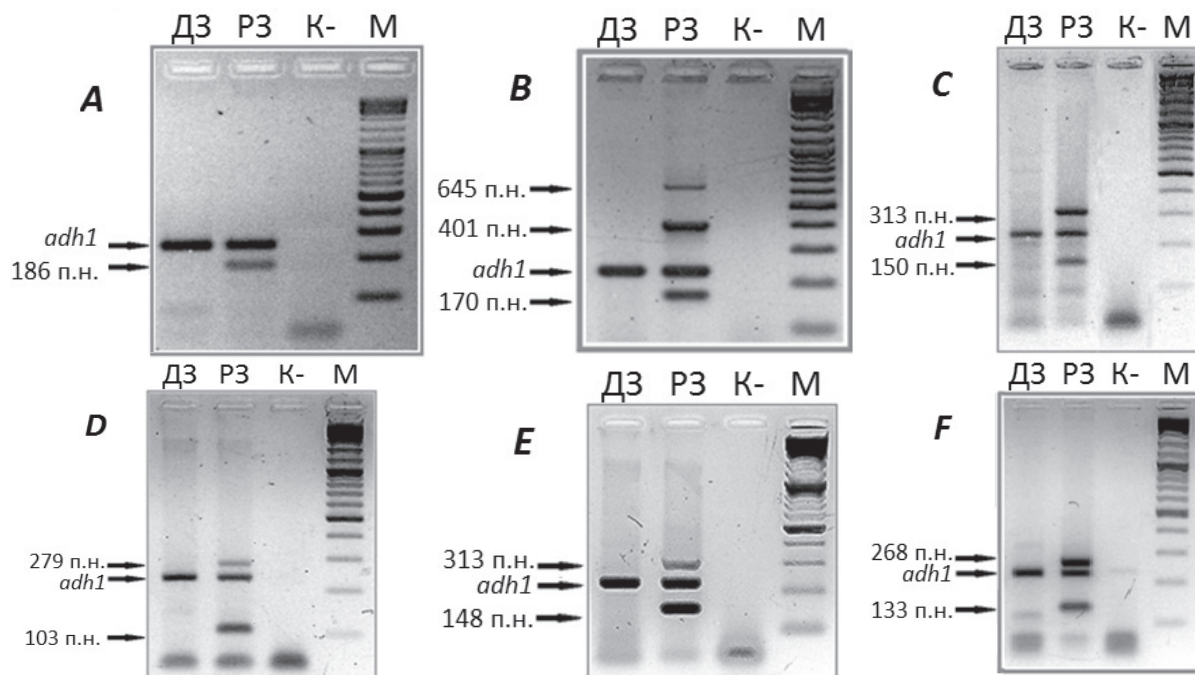


Рис. Електрофореграми продуктів ампліфікації

А. Трансформаційна подія ВТ176. Фрагмент ДНК розміром 186 п.о. складається з фрагменту РЕРС-промотору та фрагменту гену *cryIA(b)* генетичної конструкції, якою проводилась трансформація

В. Трансформаційна подія MON810. Фрагмент ДНК розміром 170 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; 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 та mg2), що додатково свідчить про наявність трансформаційної події MON810 у зразку ДНК

С. Трансформаційна подія MON88017. Фрагмент ДНК розміром 150 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; фрагмент кодуючої

послідовності гену *cry3Bb1* розміром 313 п.о.

Д. Трансформаційна подія DAS1507. Фрагмент ДНК розміром 279 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; фрагмент ДНК генетичної конструкції розміром 103 п.о.

Е. Трансформаційна подія DAS59122. Фрагмент ДНК розміром 148 п.о. складається з фрагменту гену *cry34Ab1*; фрагмент ДНК розміром 313 п.о. складається з 5'-фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація

Ф. Трансформаційна подія MIR604. Фрагмент ДНК розміром 133 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; фрагмент гену *cry3A* генетичної конструкції розміром 268 п.о.

На рисунках бачимо, що отримані

амплікони відповідають очікуваним, наведеним у таблиці. У досліджуваних зразках проявляються лише референтний ген кукурудзи *adh1*, що свідчить про наявність та якість рослинної ДНК у зразках та відсутність детектованих генів в генетичному матеріалі рослин. В референтних зразках спостерігаються як маркерний ген кукурудзи *adh1*, так і амплікони очікуваних довжин, що вказує наявність трансгенних подій та адекватність підібраних умов мПЛР. Негативні контролю не містять жодних фрагментів, що

### Висновки

Нами розроблено метод мПЛР для масового виявлення *cry* генів, які входять до складу трансформаційних подій, в зразках кукурудзи. мПЛР має переваги над звичайною ПЛР у значній економії затрат реактивів, часу персона-

свідчить про відсутність забруднень реактивів ДНК та належну якість проведення реакції.

Таким чином розроблена нами методика мПЛР дозволяє одночасно достовірно виявляти *cry* гени та трансформаційні події кукурудзи, до складу яких вони входять, і перевіряти якість виділеної загальної ДНК. Для інших трансформаційних подій кукурудзи, які містять *cry* гени (**Bt11** – *cry1A(b)*, **MON863** – *cry3Bb1*, **MON89034** – *cry1A.105* та *cry2Ab2*) була розроблена Touchdown ПЛР.

лу. мПЛР дозволяє достовірно детектувати цільові генетичні послідовності у комплексних препаратах ДНК. В експериментальних селекційних зразках кукурудзи НВФГ компанії «Маїс» *cry* генів не виявлено.

### Література

1. Hsin-Ying Huang, Tzu-Ming Pan. 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.
2. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 2003. – 1600 p.
3. Somma, M. Extraction and Purification of DNA. Session 4. In: Training Course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms – User Manual. Edited by M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede. European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg, 2006. – 229 p.
4. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений / Дрейпер Дж. Пер.с англ. Г.И.Эйснер, В.М.Андрианова. – М.: Мир, 1991. – С. 241-245.
5. 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>.
6. GMO Detection Method Database (GMDD). Режим доступу: <http://gmdd.shgmo.org>.

**MARKOVSKIY O.V., BANNIKOVA M.O., MORGUN B.V.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine  
Ukraine, 03680, Kyiv, 148 Akademika Zabolotnoho St., e-mail: molgen@icbg.org.ua*

### IDENTIFYING *CRY* GENES THAT DETERMINE INSECT RESISTANCE BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD IN TRANSGENIC MAIZE

**Aims.** Multiplex PCR was developed for detection of genetic sequences that determine insect resistance (*cry* genes) in experimental maize samples and reference samples (containing the appropriate transformation events). **Methods.** The total DNA was extracted from maize living plant tissue. Isolation and purification of DNA was carried out using CTAB method. PCR was performed by [1]. Electrophoresis of each sample (12 µl) after mPCR performed in agarose gel (1,2%) during 1,5 hour at 3,5 V/cm. **Results.** Primers to detect genes *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *mcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* were designed and selected. Multiplex for simultaneous determination of few genes were worked out. mPCR amplification of sequences was carried out to determine the presence or absence of transgenes (*cry*). **Conclusions.** Multiplex PCR was developed using reference samples. Primers to detect *cry* genes/transgenic maize events were designed and selected. No *cry* genes were found out in experimental maize samples.

**Key words:** maize, *cry* genes, transformation events, multiplex PCR.