

БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА, выпуск 3, 2010 год

УДК 633.791:575.18

КЛОНИРОВАНИЕ ПРИЛЕГАЮЩИХ РЕГИОНОВ Y-ХРОМОСОМСПЕЦИФИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*HUMULUS LUPULUS L.*)

О.С. АЛЕКСАНДРОВ, М.Г. ДИВАШУК, И.А. ФЕСЕНКО, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени КА. Тимирязева)

С помощью метода AL-PCR была расширена специфичная область Y-хромосомы хмеля обыкновенного на 264 п.о. в одну сторону и на 102 п.о. — в другую. Сравнительный анализ с другими известными последовательностями показал, что найденные новые последовательности также являются специфичными для Y-хромосомы хмеля обыкновенного.

Ключевые слова: хмель обыкновенный, определение пола растений, Y-хромосомспецифичные последовательности ДНК, клонирование.

Среди растений семейства *Cannabaceae* большое хозяйственное значение имеет хмель, который является двудомным растением [6]. Женские растения используются в пивоваренной, пищевой, текстильной и фармацевтической промышленности [2]. Кроме того, хмель представляет собой интересный объект для выявления путей возникновения и эволюции пола у растений. Его геном еще мало изучен в молекулярно-генетическом плане [1]. Однако уже давно известно, что хмель обыкновенный характеризуется XX/XУ-системой половых хромосом [7, 5, 11, 12]. Механизм их эволюционного формирования и их структурно-функциональные и молекулярно-генетические отличия всё ещё остаются практически не изученными. Известно лишь, что X- и Y-хромосомы обладают слабой гомологией, что выражается в образовании между ними одной терминальной хиазмы в мейозе [8].

Ранее были разработаны два STS-маркера, специфичных только для мужских растений хмеля [4]. Сиквенсы продуктов амплификации данных маркеров (**AJ831218** и **AJ831219**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) негомологичны известным последовательностям ДНК. Была обнаружена только слабая гомология с некоторыми последовательностями *Helianthus annuus*, *Medicago truncatula*, *Zea mays*, *Brassica oleracea*, *Gossypium hirsutum*, а также с клонами, полученными из Y-хромосомы *Homo sapiens*. Вышеуказанные последовательности могут служить якорными для дальнейшего клонирования и изучения последовательностей ДНК, специфичных для Y-хромосомы.

В связи с этим актуальной задачей является определение последовательностей, фланкирующих разработанные STS-маркеры. Для решения этой задачи был избран метод ПЦР с лигированным адаптером AL-PCR

(adaptor ligation PCR), который позволяет также определить копияность области, фланкируемой праймерами STS-маркера [13]. AL-PCR была разработана на основе методов изучения геномов человека [9] и арабидопсиса [10]. Она представляет собой сочетание лигирования специфических адаптеров с рестрикционными фрагментами и двух раундов ПЦР с праймерами, отжигающимися на границу известной последовательности и адаптор. После лигирования и трансформации продуктов ПЦР в бактериальные клетки проводится секвенирование искомым фрагментов. К основным преимуществам метода AL-PCR относится простота, относительно небольшое количество занимаемого времени (нет необходимости создания библиотек), нерадиоактивность, возможность совместить определение копияности известной последовательности и секвенирование геномного окружения.

Целью нашей работы было клонирование и характеристика фланкирующих последовательностей ДНК ранее разработанного пол-специфичного STS-маркера хмеля обыкновенного (AJ831218).

Материалы и методы

Растительный материал. Были использованы различные мужские растения хмеля, произрастающие на территории РФ.

Выделение ДНК из растительного материала. ДНК выделяли из молодых листьев по методу Bernatzky и Tanksley [3] с некоторыми модификациями.

ПЦР с лигированным адаптором. Схематическое изображение метода ПЦР с лигированным адаптором (AL-PCR) представлено на рисунке 1.

Рестрикция тотальной ДНК мужского растения хмеля. Рестриктазы должны были удовлетворять, прежде всего, следующим условиям: резать по «тупым концам», так как

это облегчает лигирование с адаптором, и не иметь сайтов рестрикции внутри сиквенса. Этим требованиям соответствовали рестриктазы *Dra I*, *HindI*, *BstFRI*.

Приготовление адаптора и лигирование. Адаптор готовили, как было описано в [13]. Использовали следующие комплементарные олигонуклеотидные последовательности: 5'-GTAATACGA-CTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCAGGT-3' и 5'-P₀-ACCTGCC-NH₂-3'. Лигирование между адаптором и рестрицированной тотальной ДНК мужского растения хмеля осуществляли по стандартной методике. Конечный объем лигазной смеси составлял 50 [л. Лигирование проводили в течение ночи при 15°C.

Аmplификация. Были подобраны праймеры на фланкирующие области исследуемого сиквенса (рис. 2) с температурой отжига 60°C.

Праймеры для сиквенса AJ831218: RB8-1 5-GGAGGGCAAGATGGGAATTA-3'; RB8-2 5-AGGGCCTTGAT-TAGTGTGCC-3'; LB8-15-GGACGGC-CAAAAAATTACAT-3'; LB8-25'-CCC-TAATCCAAAACCCTAGC-3'.

ПЦР с лигированным праймером осуществляли в два этапа. На первом этапе использовали праймеры RB8-1, LB8-1, специфичные для фланкирующих областей сиквенса, и праймер API (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') на адаптор. В качестве матрицы использовали лигазную смесь. ПЦР начиналась с «горячего старта» 94°C — 3 мин. Затем следовало 5 циклов со следующими условиями: 94°C — 30 с, 65°C — 30 с, при этом в каждом следующем цикле температура отжига снижалась на 1°C, 72°C — 1 мин. Далее следовало 40 циклов с такими же условиями при температуре отжига 60°C. ПЦР завершалась конечной элонгацией в течение 15 мин при 72°C.

Второй этап ПЦР осуществляли с адаптор-праймером AP2 (5'-ACT-

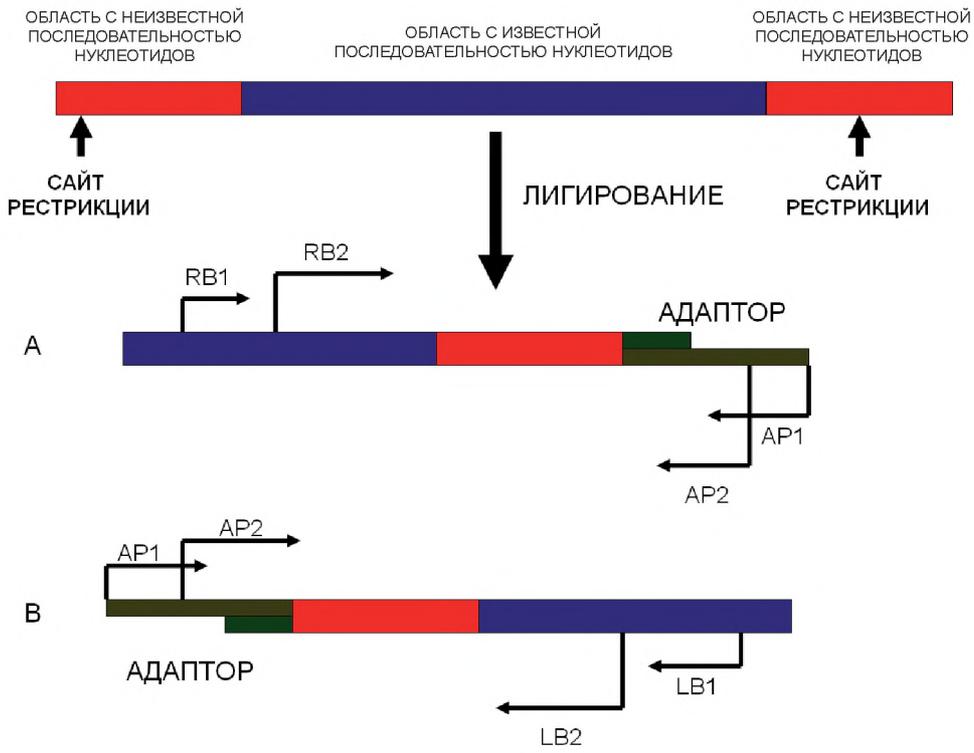


Рис. 1. Схематическое изображение метода *AL-PCR*. RB1 и LB1 — внешние праймеры соответственно на правый и левый конец известной последовательности для первого раунда ПЦР; RB2 и LB2 — внутренние праймеры соответственно на правый и левый конец известной последовательности для второго раунда ПЦР; AP1 и AP2 — внешний и внутренний праймер на адаптор

```

5'GTTTCTCTCGGGTTCTCTTGAAGAAGATGAAGCTAGAGAGATTTTGGTAG
AGTTCTTGCTATGTAATTTTTTGGCCGTCCTCTCTATCGTAAAATGA
GGGGGATTTTATAGCTAGGGTTTTGGATTAGGGTTTTTCTCCACTCA
CATGAGTCTTAATTACACCAGCCACAAAATAGGGGATACAATTACTGTAGTA
GCATGGCTACAAGACTCTATGTGGGTATATTTACGTGAAAGTATGGGGAAAT
ACACAAAGTCAGCCGTCTTTCCCAAGTTGTCAGCGGAACAGTAGGCGAAA
AGGTACTGTAACGACCCAAATTCACATAATAAGGCTTAAGGGCCTTGAT
TAGTGTGCCGGAGGGCAAGATGGGAATTAAGTGTGTTATTAT
GATTAAGATGTATGATTATGATTTAAGCATGTTATATGACTATGTGAATTA
TATTATGTGATAATTATGATATGTGAATTGT 3'

```

Рис. 2. Сиквенс AJ831218 с отмеченными праймерами

АТАГГГСАСГСГТГГТ-3') и праймерами RB8-2, LB8-2, специфичными для фланкирующих областей сиквенсов. В качестве матрицы использовали 5ц1 50-кратно разбавленного ПЦР-продукта после первого шага ПЦР.

Клонирование, трансформация, секвенирование. Для клонирования ПЦР-продуктов, полученных на предыдущем этапе, использовали вектор *pGMT-T Easy-Vector* (Promega). Лигирование проводили в течение часа при 15°C. Отбор трансформированных клонов осуществляли на основе бело-голубой селекции. Проверку на наличие вставки соответствующего размера в плазмиду осуществляли с помощью праймеров M13, фланкирующих область полилинкера *pGMT-T Easy-вектора* (Promega). Секвенирование ДНК и Blast анализ проводили по стандартным методикам и алгоритмам.

Результаты и их обсуждение

Результат проведения ПЦР с лигированным праймером после гель-электрофореза ПЦР-продуктов в 2%-м агарозном геле представлен на рисунке 3.

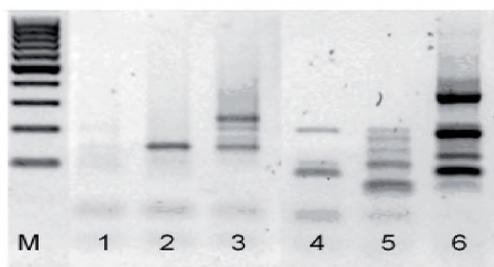


Рис. 3. Электрофореграмма AL-PCR.

1 — праймеры RB8-1/RB8-2, рестриктаза DraI, 2 — праймеры RB8-1/RB8-2, рестриктаза HincII, 3 — праймеры RB8-1/RB8-2, рестриктаза BstFnl, 4 — праймеры LB8-1/LB8-2, рестриктаза DraI, 5 — праймеры LB8-1/LB8-2, рестриктаза HincII, 6 — праймеры LB8-1/LB8-2, рестриктаза BstFnl, M — маркер размеров

Как видно из электрофореграммы, не во всех случаях амплифицируется один ПЦР-продукт. Это может быть связано с тем, что исследуемые сиквенсы являются низкокопийными повторами (около пяти копий).

Фланкирующие области сиквенса AJ831218. Далее полученные ПЦР продукты были клонированы и секвенированы. Контроль достоверности того, что полученные сиквенсы соответствуют фланкирующим последовательностям для пол-специфичных STS-маркеров осуществляли с помощью сравнения известной части сиквенса с вновь полученной. У сиквенса AJ831218 80 нуклеотидов для праймера LB8-1 и — 117 нуклеотидов для праймера RB8-1.

Праймер LB8-1 на левую границу сиквенса. На рисунке 4 представлен сиквенс одного из клонов ПЦР продукта, полученного с помощью AL-PCR на участок AJ831218. Красным цветом обозначен локус отжига праймера Ap2, зеленым цветом — праймера LB8-1, синим цветом — верифицируемая область размером 80 нуклеотидов, которая должна совпадать у вновь полученного сиквенса и у AJ831218.

Таким образом, секвенированная с использованием праймера LB8-1 область, фланкирующая AJ831218, составила 264 нуклеотида. Далее с помощью Blast анализа был проведен поиск гомологий данной области к различным нуклеотидным последовательностям. Она показала наибольшую гомологию к одному из микросателлитных сиквенсов *Humulus lupulus*. Интересно отметить, что якорная последовательность (AJ831218) была клонирована из ISSR, специфичного для мужских растений хмеля [4]. Также следует обратить внимание на наличие гомологии данной последовательности к пол-специфичному SCAR маркеру у хмеля японского (*Humulus scandens*).

дать у вновь полученного сиквенса и у AJ831218.

Таким образом, секвенированная фланкирующая область для AJ831218 с использованием праймера *RB8-1* составила 102 нуклеотида. Затем с помощью Blast анализа был проведен поиск гомологии данной области к известным нуклеотидным последовательностям других организмов. Достоверной гомологии (рис. 5) к известным последовательностям ДНК у данной последовательности выявлено не было. В предыдущем исследовании якорная последовательность также не давала гомологий [4].

Совмещение фланкирующих областей с сиквенсом AJ831218 представлено на рисунке 6.

```

CCACATACCACCCACAAAAGACAAAAGGATCCTCGCCCT
CAGGCTCAAAAAGTCACCAATTTCTTCGTGCAGTCAATAGT
AGCCCCATATCTAAACAGATAAACA AAAAGATAAGAACTG
TAGAAGTGCAGAAAIGTAACTAAACAAACCGTGTTTTAC
GTGGTTCCAGGCGTTAACAAGCCCTAGTCCACGAGTCGACC
TAATTATACTTGTAAAGAATTACAGTAAGATGGCTGGTGT
ACAAGAACTTCACACACTCACAGTCTTTCCTCGGGTTC
CTTGAAGAAGATGAAGCTAGAGAGATTTGGTAGAGTTC
TGGTATGTAAATTTTGGCCGTCCTCTCTATCGTAAATG
CGGGGTATTTAAGCTAGGGTTTGGATTAGGGTTTCT
CCACTCACATGAGTCTTAATTACACCAGCCACAAAATAGGG
GATACAATTACTGTAGTAGCATGGCTACAAGACTCTATGT
GGGTATTTACCGTAAAAGTATGGGGAATACACAAAAGTCA
CCGCTCTTTCCAAAGTGTCCAGCGGAAACAGTAGGGGAAA
GGTACTGTAAACGACCAAAATCTACTAATAAAGGCTTAAGGG
CTTTGATTAGTGTGCCGGGAGGGCAAGATGGGAATTATG
GTGGTTAATATGATTAAGATGATGATTATGATTTAAGCC
TGTATATGACTATGTGAATTATATTATGTGATAATTATG
TAAGTGAATGTACCACGTGGGTGCCGTGATACCAGTGGG
TGCACGTGCCGAAACGGTCTAGAAAACCTAGATAACGGTA
AATGGTGAATTTGGTAAACCTGTGTAACCTATTAGTA

```

Рис. 6. Сиквенс AJ831218 с фланкирующими областями (темно-серым цветом отмечен исходный сиквенс AJ831218)

Таким образом, известная ранее последовательность была расширена с левой и правой границы на 264 и 102 пары нуклеотидов соответственно. Как и в работе по исследованию сайтов встраивания трансгенов, метод продемонстрировал свою эффективность и в нашем исследовании [13]. Наличие определенной гомологии к последовательности пол-специфичного ДНК-маркера хмеля японского на левой границе якорной последовательности и факт того, что сама якорная последовательность является маркерной для мужских растений хмеля обыкновенного, свидетельствует о том, что этот сиквенс расположен в регионах хромосом, детерминирующих развитие пола у хмеля.

Дальнейшее расширение сиквенса этого региона и его изучение поможет выявить роль данного участка ДНК в развитии пола и особенности молекулярно-генетического строения половых хромосом хмеля.

Выводы

1. Показана высокая эффективность метода AL-PCR для клонирования регионов, прилегающих к специфичной последовательности Y-хромосомы хмеля обыкновенного.
2. Известная ранее последовательность была расширена с левой и правой стороны на 264 и 102 пары нуклеотидов соответственно.
3. Данные о гомологии вновь полученных сиквенсов и совмещенных сиквенсов свидетельствуют о том, что эти участки ДНК являются специфичными участками для Y-хромосомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 06-04-49753а.

Библиографический список

1. Данилова Т.В., Данилов С.С., Карлов Г.И. Исследование полиморфизма сортов хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus L.*) с использованием ISSR-ПЦР-анализа // Генетика, 2003. Т.39. № 11. С. 1484-1489.
2. Лубацкий Е.П. Хмелеводство. М.: Колос, 1993.
3. Bernatzky, R. and S.D. Tanksley. Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome // Mol. Gen Genet., 1986. 203: 8-14.

4. *Danilova T.V., Karlov G.I.* Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus L.*). *Euphytica*, 2006. V. 151. Issue. 1. P. 15-21.

5. *Karlov G.I., Danilova T.V., Horlemann C., Weber G.* Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus L.*) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica*, 2003. V. 132. Issue. 2. P. 185-190.

6. *Neve, R.A.* Hops. Chapman and Hall. London, 1991.

7. *Ono. T.* Studies in hop. I. Chromosomes of common hop and its relatives. *Bull Brew Sci*, 1955. V. 2: P. 1-65.

8. *Shephard H. L., Parker J. S., Darby P. & Ainsworth C. C.* Sexual development and sex chromosome in hop. *New Phytol*, 2000. V. 148. P. 397-411.

9. *Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. & Lukyanov, S. A.* An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1995. V. 23. P. 1087-1088.

10. *Spertini D, Beliveau C, Bellemare G.* Screening of transgenic plants by amplification of unknown genomic DNA flanking T-DNA. *Biotechniques*, 1999. V. 27. P. 308-314.

11. *Wing O.* On sex chromosomes sex determination and preponderance of females in some dioecious plants. *Compte rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg*, 1923. V. 15. P. 1-16.

12. *Wing, O.* On the nature of sex chromosomes in *Humulus*. *Hereditas*, 1929. V. 12. P. 53-63.

13. *Zheng S.J., Henken B., Sofiari E., Jacobsen E., Krens F.A., Kik C.* Molecular characterization of transgenic shallots (*Allium cepa L.*) by adaptor ligation PCR (AL-PCR) and sequencing of genomic DNA flanking T-DNA borders. *Transgenic Research*, 2001. V. 10. P. 237-245.

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

Specific area of Y-chromosome in hop (*Humulus lupulus*) has been increased by 264 units on the one side, and by 102 units on the other side by AL-PCR method. Comparative analysis of other known sequences proves that found new sequences are also specific for Y-chromosome of hop.

Key words: Hop (*Humulus lupulus*), sexing of crops, Y-chromosome specific sequences of DNA, cloning.

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н. Тел. (495) 977-72-01.

Эл. почта: divashuk@gmail.com

Александров Олег Сергеевич — асп. Тел. (495) 977-72-01.

Эл. почта: olegsandrov@gmail.com

Фесенко Игорь Александрович — к. б. н. Тел. (495) 977-72-01.

Карлов Геннадий Ильич к. б. н. Тел. (495) 977-72-01.

Эл. почта: karlovg@gmail.com