

УДК 635.21:602.6:577.152.31

<https://doi.org/10.47612/0134-9740-2022-30-46-54>**Т. А. Гапеева¹, А. Н. Пундик², Т. В. Семанюк³**¹ ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск² ООО «ГлобалГен», г. Минск³ РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», аг. Самохваловичи, Минский район
E-mail: gapееva@lab.ibp.org.by

ПЦР-ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИЗОФОРМ ФОСФОЛИПАЗЫ С В КЛЕТКАХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С АНТИСМЫСЛОВОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ ДЛЯ ГЕНА ФОСФОЛИПАЗЫ С

РЕЗЮМЕ

*Разработаны ПЦР-праймеры, а также «TaqMan»-наборы для оценки экспрессии генов изоформ фосфолипазы С (ФлС) картофеля дикого типа (WT) и трансгенных растений, экспрессирующих антисмысловую РНК для ингибирования генов ФлС. Показано, что использование «TaqMan»-наборов для генов изоформ ФлС1 и ФлС3, а также гена-нормализатора *ef1α* в дуплексной ПЦР в реальном времени позволяет определять дифференциальную экспрессию соответствующих изоформ в различных тканях растений картофеля. Методом ПЦР с детекцией в «конечной точке» показано уменьшение экспрессии генов изоформ ФлС в клетках трансгенных растений по сравнению с WT-картофелем.*

Ключевые слова: картофель; трансгенные растения; фосфолипаза С; постраскрипционное ингибирование экспрессии генов; ПЦР в реальном времени.

ВВЕДЕНИЕ

Сигналы окружающей среды и стрессовых раздражителей преобразуются в клетках растений через запуск сетей сигнальной трансдукции. Липидная сигнализация является одной из основных сигнальных сетей, так как стимул первоначально обычно воздействует на клеточную мембрану, что приводит к гидролизу мембранных липидов. Этот процесс опосредуется фосфолипазами, которые катализируют начальную стадию расщепления фосфолипидов и приводят к образованию множества вторичных мессенджеров липидного происхождения [1, 2]. Фосфолипиды составляют около 30 % от липидов плазматической мембраны [3, 4]. Фосфоинозитид-специфическая фосфолипаза С (ФлС) катализирует гидролиз фосфолипида фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата с образованием вторичных мессенджеров – диацилглицерола и инозитолтрифосфата (ИФ₃) [5, 6]. ИФ₃ открывает внутриклеточные кальциевые каналы, вызывает мобилизацию Са²⁺ из внутриклеточных депо, что является одной из причин переходного увеличения цитоплазматической концентрации свободного Са²⁺. У растений ФИ-ФлС участвует в процессах их роста и развития, в ответе на стрессовые факторы, играет ключевую роль в процессах фотосинтеза [7–11]. По сравнению с другими ФИ-ФлС растительные ФИ-ФлС образуют отдельную подгруппу. В целом гомология среди

растительных ФИ-ФлС выше 52,0 % (идентичные аминокислоты) [12]. В дополнение к высокой аминокислотной гомологии растительные ФИ-ФлС также, по-видимому, имеют общие черты на уровне вторичной структуры.

Исследование функциональной роли ФИ-ФлС растений осложняется как трудностями измерения активности этого фермента *in vivo*, так и тем, что из растительного материала не удается выделить нативные формы фосфолипазы. Существенная часть информации о строении ФИ-ФлС растений получена на основе анализа нуклеотидных последовательностей. Большинство генетических исследований ФИ-ФлС растений проведено для Резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*). Для этого вида, широко используемого в качестве модели, показано наличие 9 генов ФИ-ФлС [13, 14], в то время как у риса обнаружено 4–5 изоформ [15], в геноме томата (*Lycopersicon esculentum*) – 6 генов [16], в геноме хлопка и подсолнечника – по 12 потенциальных генов [7, 17], клонированы гены трех изоформ картофеля [12].

Одним из направлений, позволяющих исследовать функции фермента, является его ингибирование, или активация, реализуемые различными способами. Такой подход использован, в частности, для растений кукурузы путем применения ингибитора ФлС – сульфата неомидина [11]. Для изучения ФИ-ФлС картофеля указанный выше подход не применялся. Однако авторами ранее были получены трансгенные растения картофеля с генетической конструкцией для посттранскрипционного ингибирования генов ФлС [18]. Целью данной работы была разработка ПЦР-праймеров и флуоресцентно меченых «TaqMan»-зондов для изучения экспрессии изоформ фосфолипазы С в различных тканях картофеля дикого типа и трансгенных растений, экспрессирующих антисмысловую последовательность для гена фосфолипазы С картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Растения картофеля *in vitro* культивировали при 16-часовом фотопериоде ($200 \text{ мкм м}^{-2} \text{ с}^{-1}$; лампы LF 35W/54-765 фирмы Philips, Польша) при температуре 20–22 °С. Для посадки растений картофеля *ex vitro* 1,5–2,0-недельные растения *in vitro* извлекали из пробирок, освобождали от остатков агара, промывали в слабом растворе марганцовки для дезинфекции. Почвогрунт на основе торфа стерилизовали прогреванием в сушильном шкафу при температуре 140 °С 4 ч. Растения сажали в пластиковые горшки объемом 4 л, наполовину заполненные почвогрунтом, и выращивали в лабораторных условиях при естественной освещенности при температуре 22–25 °С.

Суммарную РНК для кДНК-ПЦР выделяли из листьев растений картофеля с использованием реагента *TRIzol* производства *Sigma* (США), а также с помощью набора *Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit* (*Agilent*, США).

Содержание РНК в полученных препаратах оценивали спектрофотометрическим методом на приборе *Nanodrop 2000c* (*Thermo Scientific*, США). Качество полученных препаратов оценивалось по соотношению A_{260}/A_{280} , а также методом горизонтального электрофореза в агарозном геле [19].

Препараты кДНК получали на матрице суммарной растительной РНК использованием праймеров *oligo-dT₁₈* и AMV-обратной транскриптазы производства *Thermo Fisher Scientific Baltics* (Литва). Концентрацию кДНК выравнивали по оптической плотности препаратов, определяемой на спектрофотометре *Nanodrop 2000c* (*Thermo Scientific*, США). Контроль пригодности кДНК для ПЦР-анализа проводили с использованием праймеров для гена актина картофеля (X55749): 5'-catggtattgtcagcaattg, 5'-ccacgctcagtgaggatc; размеры ПЦР-продуктов составляют 501 пн для ДНК-матрицы и 373 пн для кДНК-матрицы.

Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно меченые зонды (краситель HEX, тушитель BHQ1) были синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск). Дизайн праймеров для метода ПЦР с детекцией по конечному продукту проводили с помощью программы *Primer-BLAST*. Наборы для ПЦР в реальном времени, состоящие из праймеров и «TaqMan»-зондов, разрабатывались с использованием программы *Primer Express 3.0* (Life Technologies, США).

ПЦР проводили в термоциклере *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Био-Рад, США) с использованием ДНК-полимеразы *LC Taq* производства *Thermo Fisher Scientific Baltics* (Литва).

Реакционная смесь для ПЦР с детекцией по конечному продукту содержала также специфические олигонуклеотидные праймеры (6-12 пмоль на реакцию, кДНК-матрицы в количестве, соответствующем 50 нг тотальной РНК. Программа для термоциклера была следующей: 95 °С – 5 мин; {94 °С – 30 с, 57–59 °С – 30 с, 72 °С – 30 с} 40 циклов; 72 °С – 7 мин. Скорость изменения температуры – 1 °С/с.

Анализ продуктов ПЦР «в конечной точке» проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с добавлением красителя SYBR Green I. Результаты разделения продуктов ПЦР визуализировались при освещении гелей ультрафиолетовым светом с помощью трансиллюминатора или прибора для гель-документирования ($\lambda_{\text{детекции}} = 520 \text{ нм}$). Размеры фрагментов ДНК определялись путем сравнения с маркерными линейными фрагментами ДНК.

Составы реакционных смесей при проведении ПЦР в реальном времени с применением разработанных наборов с «TaqMan»-зондами были следующими: 1) 1X буфер; 10 mM каждого дезоксинуклеотид-3-фосфата (дНТП); 6,5 mM MgCl_2 ; 1,8 ед. ДНК-полимеразы; 0,9 нМ прямого и 0,3 нМ обратного праймера; 0,25 нМ «TaqMan»-зонда; 50–100 нг кДНК; ROX и УДГ (урацил-ДНК-гликозилаза) по стандартному протоколу (наборы для ФлС1 и ФлС3); 2) 1X буфер; 10 mM каждого дНТП; 3,5–6,5 mM MgCl_2 ; 1,8 ед. ДНК-полимеразы; 0,1 нМ прямого и обратного праймера; 0,15 нМ «TaqMan»-зонда; 50–100 нг кДНК; ROX и УДГ по стандартному протоколу (EF1-набор).

Программа для термоциклера была следующей: 50 °С – 7 мин, 95 °С – 7 мин, 45 циклов {94 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 20 с}; скорость набора температуры 2 °С/с.

Нормализованные значения экспрессии при проведении ПЦР-РВ рассчитывались на основе формулы «Дельта C_t » [20]. В качестве гена-нормализатора использовали ген фактора элонгации картофеля *ef1 α* (*Gene Bank*: AV061263).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В соответствии с опубликованными данными по изучению кодирующих областей генов изоформ ФИ-ФлС картофеля гомология между изоформами *stplc1*, *stplc2*, *stplc3* составляет от 68 до 81 %, при этом рассчитанная гомология идентичности аминокислотных последовательностей – от 63 до 77 % [12]. Результаты анализа указывают также на то, что изоформы 2 и 3 (ФлС2 и ФлС3) более тесно связаны друг с другом, чем с любой другой растительной ФИ-ФлС. Изоформа ФлС1, по видимому, так же отдаленно связана с ФлС2 и ФлС3, как и с ФИ-ФлС других видов растений. Изоформы ФИ-ФлС картофеля не содержат явных субклеточных сортирующих сигналов или трансмембранных доменов, поэтому эти белки, скорее всего, расположены в цитозоле и, учитывая их предполагаемую роль, могут быть связаны с плазматической мембраной.

По результатам сравнения с последовательностями кДНК *Solanum tuberosum* с помощью программы *BLAST* (*blastn*) кДНК *NTplc1 Nicotiana tabacum* имеет следующие

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

значения идентичности с кДНК *Solanum tuberosum*: около 70 % для *Stplc1* (X93564.1), около 80 % для *Stplc2* (X94183.1), около 90 % для *Stplc3* (X94289.1).

Олигонуклеотидные праймеры для определения экспрессии изоформ фосфолипазы С подбирались с учетом наличия специфичности по отношению к нуклеотидной последовательности к какой-либо одной из трех изоформ фермента и отсутствия способности синтезировать ПЦР-продукты на матрице кДНК как двух других изоформ, так и последовательности *NtPLC1 Nicotiana tabacum*, встроенной в геном растений в составе генетической конструкции для постраскрипционного ингибирования генов ФлС картофеля. Для последовательности *Ntplc1* табака были подобраны специфические праймеры (NtPLC1, табл. 1), которые не имеют гибридизационного сродства к генам ФлС картофеля. Ампликон с ожидаемым размером в 419 пн подтверждает наличие у трансформированных растений конструкции с последовательностью гена ФлС табака, в то время как у контрольного нетрансформированного растения картофеля (WT, дикий тип) данный ПЦР-продукт отсутствует.

С целью подбора праймеров для определения экспрессии генов изоформ ФлС картофеля с детекцией по «конечной точке» ПЦР-методом гель-электрофореза олигонуклеотиды, последовательности которых приведены в таблице 1, были протестированы при проведении ПЦР на матрице кДНК растений картофеля *in vitro*. Использование данных праймеров в реакции кДНК-ПЦР показало, что олигонуклеотиды StPLC1b и StPLC3b не дают удовлетворительных результатов амплификации на матрице кДНК картофеля. Праймеры StPLC1a для ФлС1 не являются специфичными для гена фосфолипазы С картофеля, то есть присутствуют ПЦР-сигналы в области ожидаемых размеров ампликонов также и для табака (рис. 1). Тем не менее для праймеров StPLC1a, как и для StPLC2a (ФлС2), StPLC2b (ФлС2) и StPLC3a (ФлС3), наблюдается ослабление сигналов для ПЦР-продуктов ожидаемого размера у растений с бессмысловой конструкцией по сравнению с растениями картофеля дикого типа (нетрансформированными), что может указывать на наличие функциональной активности конструкции для постраскрипционного ингибирования. Однако известно,

Таблица 1 – Последовательности праймеров для генов фосфолипазы С

Наименование пары праймеров	Ориентация праймера	Последовательность праймера (5' –3')	Ожидаемый размер ампликона, пн	Локализация
StPLC1a	S	AGTGATTGCAGCGACGTGCC	301	Ген ФлС1 картофеля
	A	AGCATTTCTGCCCCACAGGTGA		
StPLC1b	S	AGTGATTGCAGCGACGTGCC	907	
	A	AGCCACAGCCACCATTTGCT		
StPLC2a	S	AATCACGGCGGCGACTCCAA	319	Ген ФлС2 картофеля
	A	GCGCCACTGGAGCAGTCAGT		
StPLC2b	S	TTACCATGGCTGCCGCCGAA	480	
	A	GCGCCACTGGAGCAGTCAGT		
StPLC3a	S	ACAGGCCCTGCACAGAGGTG	776	Ген ФлС3 картофеля
	A	TGAGTCCATGTGTCCATGCGT		
StPLC3b	S	CGGCGACGGTTCCGGGTA	105	
	A	CCGATGAAGATTCTCCGCGCT		
NtPLC1	S	ACCTCGGCCACAGGGCTTGTA	419	Ген ФлС1 табака
	A	TCTGTTTCCGGCGGCGGTTTC		

Примечание. S – смысловой (прямой) праймер, A – антисмысловой (обратный) праймер.

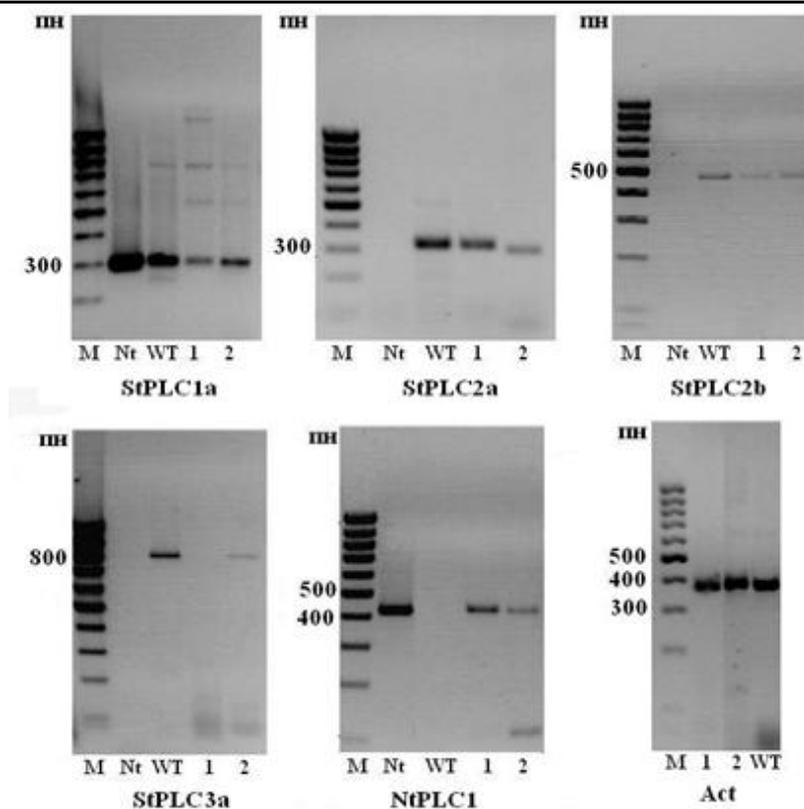


Рисунок 1 – Подбор ПЦР-праймеров для генов изоформ ФЛС картофеля

Примечание. Результаты ПЦР с праймерами StPLC1a, StPLC2a, StPLC2b, StPLC3a для изоформ гена фосфолипазы С картофеля, NtPLC1 для гена ФЛС табака, Act для гена актина картофеля: Nt – на матрице кДНК *Nicotiana tabacum*; WT – на матрице кДНК контрольного растения дикого типа (нетрансформированного) сорта Ветразь; 1,2 – на матрице кДНК трансформированных растений *BGDA.1* и *BGDA.9* соответственно. М – маркеры размеров линейных фрагментов ДНК «GeneRuler 100 bp DNA Ladder».

что изменения в интенсивности ПЦР-сигнала, детектируемого на плато (в «конечной точке») кинетической кривой ПЦР, не всегда коррелирует с количеством исходной ПЦР-матрицы. Для более точного подтверждения наличия эффекта ингибирования необходимо детектировать флуоресцентный сигнал на экспоненциальном участке кинетической кривой ПЦР, а также более точно определять его интенсивность, то есть использовать метод ПЦР в реальном времени.

С целью разработки метода для сравнительного анализа экспрессии изоформ фосфолипазы С подобранные праймеры были протестированы в ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green. Однако условий ПЦР с SYBR Green для данных праймеров подобрать не удалось, поэтому были также разработаны «TaqMan»-наборы, состоящие из ПЦР-праймеров и гибрида зонда на внутренний участок амплифицируемого фрагмента, содержащего на концах флуоресцентную метку (FAM, или HEX) и тушитель флуоресценции метки (BHQ1). Следует отметить, что коммерческие «TaqMan»-наборы для растительной ФИ-ФЛС не производятся. Для подбора праймеров и зондов были протестированы олигонуклеотиды, последовательности которых приведены в таблице 2.

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

Таблица 2 – Олигонуклеотиды, используемые при разработке наборов «TaqMan»-зондов для определения экспрессии генов изоформ ФлС методом ПЦР в реальном времени

Наименование набора	S/A, M	Нуклеотидная последовательность	Модификация			
			5'–	3'–		
ФлС1	S	TTCATTTACACCAGTCACAATACSTATCT	FAM	BHQ1		
	A	AGGCACGTCGCTGCAATC				
	M	ACTGGGAATCAACTCAAT				
ФлС2	S	GCTGCCGCCGAAGCT				
	A	TCCGCTGTCGTCGGAATAAC				
	M	CGGCAGACATTAAG				
ФлС3	S	GAGAATATACCCAAAGGGCATAACG			HEX	BHQ1
	A	GTGTCCATGCGTTGAAAGGA				
	M	TTGACTCATCCAATTAC				
Актин	S	TGTGTTCCCTAGCATTGTTGGA				
	A	TGGCCCATGCCAACCA				
	M	CTCGTCGCACTGGTG				
EF1	S	TGACAGGCGTTCAGGTAAGGA	HEX	BHQ1		
	A	CCAGCATCACCGTTCCTCAA				
	M	CTTGAGAAGGAGCCTAAG				

Примечание. S – смысловой (прямой) праймер, А – антисмысловой (обратный) праймер, М – флуоресцентный зонд, FAM, HEX – флуоресцентные красители, BHQ1 – тушитель флуоресценции.

Критерием выбора «TaqMan»-набора для дальнейшей работы было наличие одинаковой эффективности в синглплексной и дуплексной (для гена фосфолипазы С и гена-нормализатора) реакциях. В результате для дальнейшей работы был выбран набор для гена-нормализатора – фактора элонгации *ef1α* (EF1), а также наборы для изоформ *Stplc1* и *Stplc3* (ФлС1 и ФлС3).

Выбранные наборы были также протестированы на способность различать изменения в экспрессии изоформ *Stplc1* и *Stplc3* в различных тканях растений картофеля дикого типа и двух трансгенных линий *BGDA.2* и *BGDA.8*, экспрессирующих антисмысловую последовательность *NtPLC1*. Результаты приведены на рисунке 2. В соответствии с рисунком видно, что при применении «TaqMan»-наборов детектируется наличие экспрессии соответствующих изоформ фосфолипазы С в листьях растений *in vitro* и *ex vitro*, а также в клубнях и ростках. Для трансгенной линии *BGDA.8* можно также отметить снижение экспрессии *Stplc1* в листьях трансформированных растений по сравнению с растениями дикого типа. В клубнях трансгенных растений наблюдается тенденция к уменьшению экспрессии генов *Stplc1*, *Stplc3* по сравнению с нетрансформированными растениями (дикий тип). Следует отметить, что уровень экспрессии генов ФлС, детектируемый в листьях растений *in vitro* с помощью «TaqMan»-наборов, довольно низкий, что в данном случае предполагает возможное преимущество метода с детекцией в «конечной точке», результаты применения которого описаны выше. Важно также уточнить, что при проведении данного эксперимента не ставилась задача установления наличия статистически значимых различий, поэтому не предусматривалось необходимое для этого количество технических и биологических повторностей. Однако полученные результаты подтвердили возможность использования разработанных «TaqMan»-наборов для изоформ *Stplc1* и *Stplc3* в дуплексной реакции с «TaqMan»-набором для гена нормализатора *ef1α* при изучении дифференциальной экспрессии генов соответствующих изоформ фосфолипазы С картофеля.

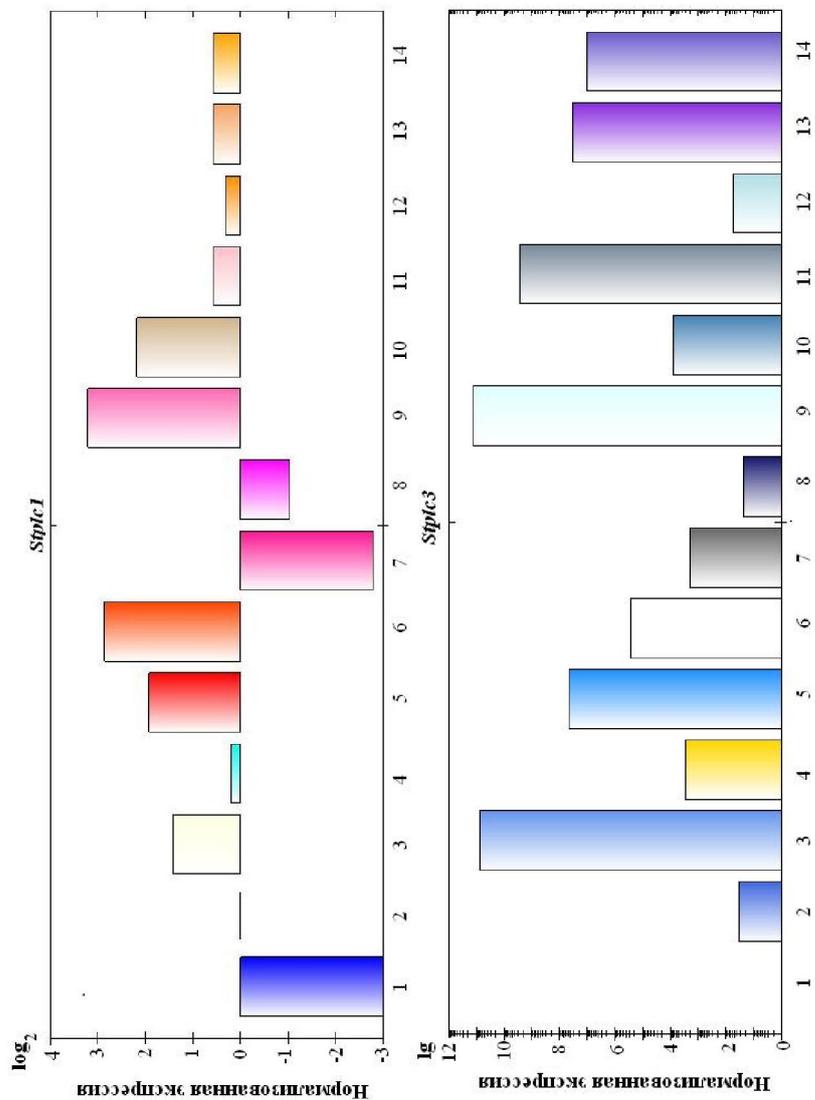


Рисунок 2 – Экспрессия генов *Stplc1* и *Stplc3* в тканях растений картофеля

Примечание. Нормализованные по методу «Дельта с_t» значения для экспрессии генов *Stplc1* и *Stplc3*, полученные с использованием «ТадМат»-наборов для следующих образцов: 1 – лист растения табака *in vitro*; 2 – лист WT-растения картофеля *in vitro*; 3, 7 и 11 – клубни WT, *BGAA.2* и *BGAA.8* растений картофеля перед посадкой соответственно; 4, 8 и 12 – ростки клубней WT, *BGAA.2* и *BGAA.8* растений картофеля перед посадкой соответственно; 5 и 6, 9 и 10, 13 и 14 – лист WT, *BGAA.2* и *BGAA.8* растений картофеля через два месяца после посадки соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны ПЦР-праймеры для оценки экспрессии генов изоформ фосфолипазы С картофеля. Праймеры использованы при проведении ПЦР с детекцией в «конечной точке» для определения наличия эффекта постраскрипционного ингибирования фосфолипазы С в клетках линий трансгенных растений картофеля *in vitro*, экспрессирующих антисмысловую последовательность *Ntplc1 Nicotiana tabacum*. Показано уменьшение экспрессии изоформ *Stplc1*, *Stplc2*, *Stplc2* для трансгенных растений по сравнению с растениями картофеля, дикого типа, что может указывать на наличие функциональной активности конструкции для постраскрипционного ингибирования. Разработаны «TaqMan»-наборы, включающие флуоресцентно меченые зонды, для оценки экспрессии генов изоформ ФлС1 и ФлС3 картофеля, а также гена-нормализатора *eflα* (фактора элонгации картофеля) методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Наборы протестированы в дуплексной ПЦР-РВ при определении уровня нормализованной экспрессии соответствующих изоформ фосфолипазы С в тканях листьев, клубней и ростков картофеля. Разработанные «TaqMan»-наборы могут быть использованы для изучения экспрессии генов соответствующих изоформ фосфолипазы С в тканях растений картофеля дикого типа и трансгенных растений, экспрессирующих антисмысловую последовательность *Ntplc1*.

Список литературы

1. Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function / A. Mamode Cassim [et al.] // Prog. Lipid Res. – 2019. – Vol. 73. – P. 1–27.
2. Boss, W. Lipid-mediated signaling / W. Boss, D. Lynch, X. Wang // Annual Plant Reviews. – 2008. – Vol. 33. – P. 202–43.
3. Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in Arabidopsis / M. S. Grison [et al.] // Plant Cell. – 2015. – Vol. 27, № 4. – P. 1228–1250.
4. Meijer, H. J. Phospholipid-based signaling in plants / H. J. Meijer, T. Munnik // Annu. Rev. Plant Biol. – 2003. – Vol. 54. – P. 265–306.
5. Wang, X. Plant phospholipases / X. Wang // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 211–231.
6. Plant phospholipase C family: Regulation and functional role in lipid signaling / A. Singh [et al.] // Cell Calcium. – 2015. – Vol. 58. – P. 139–146.
7. Zhang, B. Genome-wide identification and characterization of phospholipase C gene family in cotton (*Gossypium* spp.) / B. Zhang, Y. Wang, J. Y. Liu // Sci. China Life Sci. – 2018. – Vol. 61. – P. 88–99.
8. Biochemical characterization of the tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) family and its role in plant immunity / A. M. Abd-El-Haliem [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2016. – Vol. 1861. – P. 1365–1378.
9. Arabidopsis AtPLC2 is a primary phosphoinositide-specific phospholipase C in phosphoinositide metabolism and the endoplasmic reticulum stress response / K. Kanehara [et al.] // PLoS Gene. – 2015. – Vol. 11. – P. e1005511.
10. Arabidopsis phosphoinositide-specific phospholipase C 4 negatively regulates seedling salt tolerance / K. Xia [et al.] // Plant Cell Environ. – 2017. – Vol. 40. – P. 1317–1331.
11. Involvement of Phospholipase C in Photosynthesis and Growth of Maize Seedlings / Y. Wei [et al.] // Genes (Basel). – 2022. – Vol. 13, № 6. – P. 1011.
12. Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato / J. Kopka [et al.] // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 116. – P. 239–250.

13. A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis* / Y. J. Nakamura [et al.] // *Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 7469–7476.
14. Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana* / I. M. Tasma [et al.] // *Plant Physiol. Biochem. PPB.* – 2008. – Vol. 46. – P. 627–637.
15. Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase-C (PI-PLC) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance / J. H. Vossen [et al.] // *Plant J.* – 2010. – Vol. 62. – P. 224–239.
16. Comprehensive genomic analysis and expression profiling of phospholipase C gene family during abiotic stresses and development in rice / A. Singh [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 4 – P. e62494.
17. Genome-Wide Analysis and Expression Profiling of the Phospholipase C Gene Family in Soybean (*Glycine max*) / F. Wang [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 9 – P. e0138467.
18. Создание растений картофеля с генами для ингибирования синтеза фосфолипазы C / А. Н. Пундик [и др.] // *Картофельводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству.* – Минск, 2012. – Т. 20. – С. 85–94.
19. Sambrook J. W. *Molecular cloning: A Laboratory manual* / J. W. Sambrook // N.Y: Cold Spring Harb. Lab.Press. – 1989.
20. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – Vol. 4 – P. 402–408.

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

T. A. GAPEEVA, A. N. PUNDIK, T. V. SEMANYUK

PCR PRIMERS AND PROBES FOR EVALUATING THE EXPRESSION OF PHOSPHOLIPASE C ISOFORM GENES IN TRANSGENIC CELLS OF POTATO PLANTS WITH ANTISENSE CONSTRUCTION FOR PHOSPHOLIPASE C GENE

SUMMARY

PCR primers, as well as TaqMan-kits have been developed for evaluating gene expression of phospholipase C (PLC) isoforms in wild-type potato (WT) and transgenic plants expressing antisense RNA to inhibit PLC genes. Using the TaqMan-kits for the genes of PLC1 and PLC3 isoforms, as well as for the gene-normalizer efl α in duplex real-time PCR determines the differential gene expression of the PLC isoforms in various tissues of potato plants. The «endpoint» PCR established a decrease in the expression of the PLC genes in transgenic plants compared with WT.

Key words: potatoes; transgenic plants; phospholipase C; post-transcriptional inhibition of gene expression; real-time PCR.