УДК 577.21:582.912.42

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА СУММАРНОЙ ДНК ВЫСОКОГО КАЧЕСТВА ИЗ РАСТЕНИЙ РОДА RHODODENDRON

[1]Калаев В.Н., [2]Землянухина О.А., [2]Карпеченко И.Ю., [2]Карпеченко К.А., [1]Кондратьева А.М., [1]Вепринцев В.Н., [1]Карпеченко Н.А., [1]Карпова С.С.

[1]Воронежский государственный университет, Воронеж, e-mail: dr_huixs@mail.ru;
[2]Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции, Воронеж, e-mail: nikitakarpechenko@rambler.ru

Проведено исследование по изучению эффективности применения стандартной методики выделения ДНК из растений рода Rhododendron. Оценку методики выделения проводили на основе трех параметров: возможной деградации ДНК в ходе электрофоретического разделения полученных препаратов в агарозном геле, концентрация и чистота полученных образцов, анализируемых по спектрофотометрическим характеристикам препаратов, и воспроизводимость результатов ПЦР. Показано, что стандартный метод выделения нуклеиновых кислот не является пригодным по отношению к растениям данного рода и дальнейшие исследования не возможны по причине сильной деградации образцов и содержания большого количества примесей, препятствующих проведению реакций рестрикции и ПЦР. Для получения качественного препарата ДНК были изменены некоторые этапы и подобраны оптимальные температурные, временные и концентрационные параметры методики, что, в свою очередь, позволило получить образец дезоксирибонуклеиновой кислоты без признаков деградации и примесей.

Ключевые слова: выделение, цетилтриметиламмоний бромид, рододендрон, ДНК, деградация, ПЦР

DEVELOPMENT OF METHOD FOR OBTAINING OF TOTAL HIGH QUALITY DNA-PREPARATIONS FROM PLANTS OF RHODODENDRON

[1]Kalaev V.N., [2]Zemlyanukhina O.A., [2]Karpechenko I.Y., [2]Karpechenko K.A., [1]Kondratieva A.M., [1]Veprintsev V.N., [1]Karpechenko N.A., [1]Karpova S.S.

[1]Voronezh State University, Voronezh, e-mail: dr_huixs@mail.ru;
[2]Research Institute of Forest Genetics and Breeding, Voronezh, e-mail: nikitakarpechenko@rambler.ru

The research was conducted on the effectiveness of the standard methods of DNA extraction from plants of the genus of Rhododendron. The assessment of the methodologies was made on the basis of three parameters: the possible degradation of DNA in the preparations obtained by agarose gel electrophoresis, the concentration and purity of the samples, analyzed by spectrophotometric characteristics of DNA preparations, and reproducible PCR results. It was shown that the standard method of nucleic acid extraction is unsuitable for the plants of this genus, and further studies are not possible due to severe degradation of the samples and high level of admixture, which prevents the restriction reaction and the PCR. In order to obtain a DNA preparation of good quality, some steps of the method were modified; the optimal temperature, time and concentration parameters were found, making possible to get a DNA sample free from signs of degradation and admixture.

Keywords: extraction, CTAB, rhododendron, DNA, degradation, PCR

В настоящее время наряду с традиционными методами изучения растений в селекционных, генетических и таксономических исследованиях всё большее значение приобретают методы, основанные на выяснении изменчивости ДНК и ее структуры. Данные методы позволяют с высокой точностью определить характер изменчивости генетического материала, что даёт возможность уже на ранних стадиях развития растения выявить особи с наиболее ярко выраженными полезными качествами [4]. Однако для проведения молекулярно-генетических исследований, связанных с изучением структуры генов, на первом этапе необходимо получить чистый препарат ДНК без признаков деградации и примесей.

Было экспериментально установлено, что лучшие результаты получаются при выделении ДНК из почек и молодых листьев растения [5], в то время как во всех мертвых клетках (например, в ксилеме покрытосемянных) наблюдается деградация ДНК, что делает невозможным проведение дальнейшего анализа. Особое внимание необходимо уделять и видовой принадлежности изучаемого образца, так как растения разных видов характеризуются различными физиологическими и биохимическими особенностями как, например, присутствием различных веществ (полисахаридов, танинов, полифенолов и их хинонокисленных продуктов), создающих значительные примеси в препаратах нуклеиновых. Физико-химические свойства подобных веществ в определенной степени совпадают со свойствами нуклеиновых кислот, что затрудняет их полное отделение от ДНК и обусловливает низкое качество препаратов, что делает непригодным их дальнейшее использование.

Объектом наших исследований стали растения рода рододендрон (*Rhododendron L.*). Это многочисленный род растений семейства Вересковые (*Ericaceae*), включа-

ющий около тысячи видов вечнозеленых, полулистопадных и листопадных кустарников и деревьев. Рододендроны лишь сравнительно недавно стали у нас по-настоящему популярны. Есть несколько причин этому: во-первых, некоторые из них – единственные вечнозеленые лиственные растения, зимующие в нашем климате. Во-вторых, цветение рододендронов – удивительное зрелище, с которым мало что может сравниться [7]. Известно также, что рододендроны содержат большое количество дубильных веществ, что необходимо принимать во внимание при проведении молекулярно-генетических исследований растений данного рода, требующих выделения ДНК.

Целью настоящей работы явилось исследование возможности применения стандартной методики выделения ДНК из растений на представителях рода *Rhododendron* и оптимизации данной методики для конкретного объекта.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили листья растений рододендрона.

Процесс выделения ДНК включает несколько этапов.

Первый этап связан с разрушением клеточных структур. Для разрушения мембран используется механическое воздействие путем растирания ткани в специальных гомогенизаторах или вручную с помощью пестика. Однако следует отметить, что при выборе разрушающего агента и метода разрушения клеточных структур важно учитывать возможность повреждения молекул ДНК самими агентами или условиями выделения [1].

На следующем этапе выделения ДНК проводится ее очистка от разрушенных клеточных структур, высоко- и низкомолекулярных соединений. Удаление белков осуществляют путем их денатурации с помощью фенола, хлороформа, ацетона и некоторых солей.

Важным этапом при выделении ДНК является ее осаждение. Наиболее часто используемый метод концентрирования – осаждение ее изопропанолом или этанолом [5].

В ряде случаев требуется очистка препаратов от содержания РНК. Это достигается применением фермента РНК-азы [2].

Задачей данного исследования явилось изучение возможности применения стандартной методики выделения ДНК из растений [10] на представителях рода *Rhododendron*. Основным способом получения ДНК является метод, основанный на использовании ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид)-буфера. Данная методика основана на том, что при высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные и растворимые соединения с цетилтриэтиламмоний бромидом. При снижении концентрации соли NaCl ниже 0,4 М комплекс ЦТАБ – нуклеиновая кислота выпадает в осадок. После разрушения клеток белки денатурируют и экстрагируют смесью хлороформа с изоамиловым спиртом. ЦТАБ удаляют путем осаждения этанолом (ЦТАБ растворим в этаноле, а ДНК нет). В данной методике предполагается использование четырех буферных растворов (2х ЦТАБ буфер, 5х ЦТАБ буфер, буфер для преципитации и HS-TE буфер) следующего состава:

1. 2х ЦТАБ буфер (2 % ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 0,1 М Tris-HCl, pH 8.0, 20 мМ ЭДТА).
2. 5х ЦТАБ буфер (5 % ЦТАБ, 350 мМ ЭДТА).
3. Буфер для преципитации (1 % ЦТАБ, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА).
4. HS-TE буфер (1 М NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА).

В общем виде схема выделения выглядит следующим образом:

1) ткань растереть в ступке с жидким азотом до светло-зелёной пудры;

2) подготовить прогретую до 65°С пробирку с 2х ЦТАБ (из расчёта 25 мл 2х ЦТАБ на 2–5 г ткани);

3) перенести пудру шпателем в пробирку, очень хорошо и быстро перемешать;

4) инкубировать при 65 °С минимум 20 мин (лучше 1 ч, но можно и больше (2–3 ч));

5) охладить до нормальной температуры (22–24 °С), добавить равный объём смеси хлороформа и изоамилового спирта (в соотношении 24:1), перемешивать примерно 20 мин при нормальной температуре;

6) центрифугировать 11000g при нормальной температуре 30 с;

7) снять водную фазу, добавить к ней 0,2 объема 5х ЦТАБ;

8) перемешать, инкубировать при 65 °С 10 минут;

9) добавить равный объём смеси хлороформа и изоамилового спирта (в соотношении 24:1), перемешивать примерно 10 мин при нормальной температуре;

10) центрифугировать 11000g при нормальной температуре 10 мин;

11) если раствор мутный или большая интерфаза – повторить экстракцию хлороформом и изоамиловым спиртом (пункты 9–10);

12) добавить равный объём буфера для преципитации (можно и 2–3 объёма), перемешать и оставить на 1 ч (или на ночь) при нормальной температуре;

13) центрифугировать 5000–8000 g при нормальной температуре 20 мин (если ДНК не выпадает, добавить больше буфера для преципитации, оставить при комнатной температуре на 1 ч, отцентрифугировать);

14) растворить осадок в 1–2 мл HS-TE (иногда необходим нагрев до 65 °С);

15) добавить 2 объема абсолютного этанола, инкубировать 1–2 ч при –20 °С или 30 мин при –70 °С;

16) центрифугировать 8000 g при 4 °С, 10 мин;

17) к осадку добавить 200 мкл дистиллированной воды и 100 мкл 7,5 М ацетата аммония (pH 7,5), инкубировать 20 мин при 0 °С;

18) центрифугировать 13000 g при 4 °С 10 мин;

19) добавить к супернатанту 2 объема абсолютного этанола и инкубировать 20 мин при –70 °С;

21) центрифугировать 13000 g при 4 °С 10 мин;

22) сполоснуть 80 %-м этанолом;

23) растворить в ТЕ буфере или воде, хранить при –20 °С.

Оценку эффективности выделения ДНК из листьев рододендрона проводили, используя электрофоретическое разделение полученных препаратов в агарозном геле, спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты образцов, а также ПЦР [8].

Поскольку концентрация и чистота препарата ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа, необходимо установление

значений этих показателей с помощью спектрофотометра (в наших исследованиях был использован спектрофотометр СФ-102). Для определения количества ДНК измеряли поглощение раствора в областях с длинами волн 260 и 280 нм. Измерение при 260 нм позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе. Оптическая плотность D = 1 A соответствует приблизительно 50 мкг/мл двухцепочечной ДНК. Соотношение экстинкции 260 нм/280 нм позволяет судить о чистоте нуклеиновой кислоты. Чистые препараты ДНК имеют соотношение не менее 1,67 [3].

Наличие деградации в образцах может привести к неправильной спектрофотометрической оценке концентрации ДНК, к ее завышению вследствие явления гиперхромизма. Кроме того, данные препараты в дальнейшем малопригодны для работы по изучению и манипуляции с крупными фрагментами ДНК, поэтому для определения степени деградации молекул в полученных препаратах нами проводился электрофорез в 2 %-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Реакцию ПЦР проводили с использованием RAPD-праймера Oligo 29 в амплификаторе «Терцик» в течение 2 часов. Для ПЦР была использована реакционная смесь следующего состава: 2,5 мкл 10·ПЦР буфера (100 мМ Трис-HCl; pH 8,8; 500 мМ KCl), 25 мМ MgCl2, смесь 10 мМ нуклеотидтрифосфатов, 10 мМ праймера, 1 ед. Taq ДНК-полимераза и 1 мкл ДНК (20 нг/мкл).

Параметром оценки эффективности ПЦР являлась воспроизводимость результатов с использованием данного способа экстракции ДНК, а также наличие или отсутствие фоновой амплификации, приводящей к появлению шмеров на электрофореграмме.

Результаты исследования и их обсуждение

Использование стандартной методики для выделения ДНК ЦТАБ-методом из растений на рододендроне (весь процесс выделения занимает в среднем 7–8 часов) позволило нам получить препараты суммарной ДНК. Спектрофотометрическое исследование чистоты полученных образцов показало, что соотношение поглощения при 260 нм/280 нм было равно в среднем, 1.15. Это свидетельствует о том, что полученные образцы ДНК содержат примеси в больших количествах. Анализ электрофореграмм образцов ДНК рододендрона (рис. 1) позволяет говорить о деградации препарата.

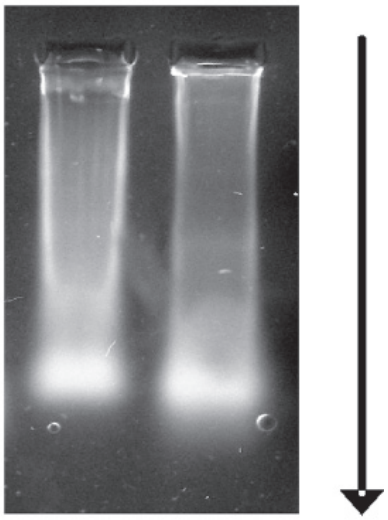

Рис. 1. Электрофореграмма образцов ДНК рододендрона, выделенных ЦТАБ-методом по стандартной методике

Оценку эффективности ПЦР проводили с использованием RAPD-праймера Oligo 29 (рис. 2).

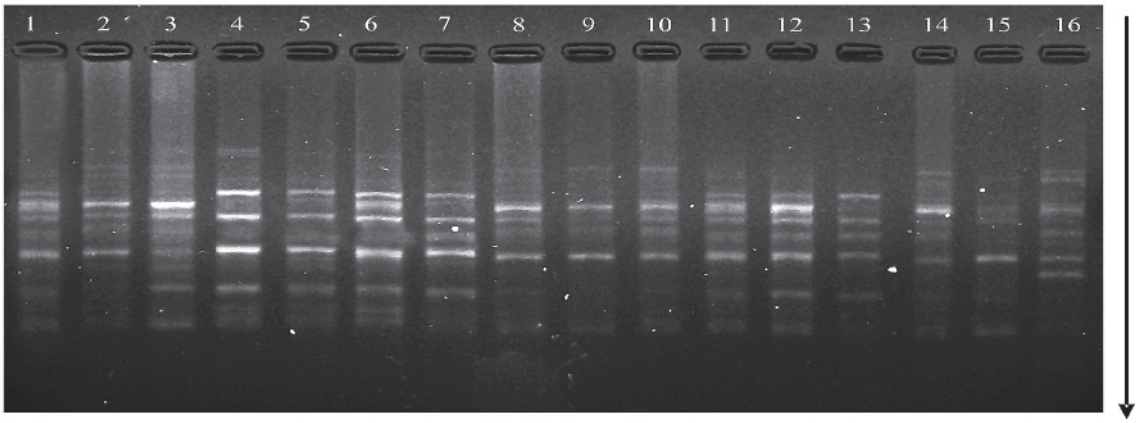

Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР рододендрона с использованием RAPD –праймера Oligo 29, где в качестве матрицы использовалась ДНК, полученная по стандартной методике: 1…16 – номера повторностей

В результате проведения ПЦР с праймером Oligo 29, где в качестве матрицы использовалась ДНК, выделенная по стандартной методике, оказалось, что в большинстве случаев на электрофореграмме наблюдалось наличие шмера, в некоторых пробах вообще отсутствовали продукты амплификации, что свидетельствует о непол-

ном удалении ингибиторов. Воспроизводимость результатов ПЦР равнялась 76 %, что является весьма плохим результатом.

Обобщив полученные данные, можно заключить, что данный метод экстракции ДНК не является эффективным для растений рода *Rhododendron.*

Нами были изменены некоторые этапы стандартной методики и подобраны оптимальные температурные, временные и концентрационные условия, которые позволили получить препарат ДНК высокой концентрации с отсутствием деградации и примесей, что подтверждается спектрофотометрически и электрофореграммой в агарозном геле (рис. 3). Полученные образцы имели соотношение поглощения при 260 нм/280 нм равное, в среднем, 1,75, что свидетельствует о чистоте полученных препаратов ДНК.

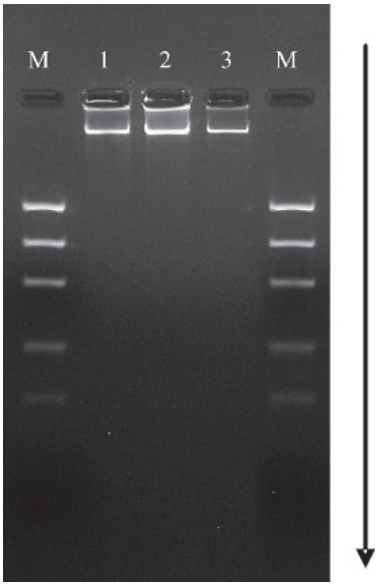

Рис. 3. Электрофореграмма образцов ДНК рододендрона, выделенных ЦТАБ-методом по изменённой методике: М – маркеры, 1, 2, 3 – номера повторностей

Адаптированная для растений рода рододендрон методика отличается сравнительной быстротой (4 ч вместо 7–8 ч) и простотой (используется всего один буфер).

Для выделения суммарной клеточной ДНК использовали ЦТАБ-буфер следующего состава: 3 % ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 0,2 % 2-меркаптоэтанол, 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0).

В общем виде усовершенствованная нами схема проведения выделения выглядит следующим образом:

1) образец ткани тщательно растирают пестиком в течение 5 минут в 1000 мкл, предварительно прогретого до 65 °С ЦТАБ-буфера;

2) инкубируют в термостате при 65 °С в течение 30 мин, периодически перемешивая раствор вращением пробирки (трясти пробирку не рекомендуется, т.к. буфер пенится, ДНК разрушается);

3) остудив пробирку до комнатной температуры, добавляют равный объём смеси хлороформ – изоамиловый спирт (24:1) и перемешивают медленным покачиванием в течение 20 мин;

4) разделяют фазы центрифугированием 15 мин (12000 g); супернатант переносят в чистую пробирку объемом 2 мл;

5) добавляют 2/3 объема изопропанола;

6) оставляют на 1 час при –20 °С для осаждения ДНК;

7) центрифугируют 15 мин (13000 g), отбирают изопропанол;

8) добавляют два объема 80 %-го этанола, инкубируют 15 мин, центрифугируют 15 мин (13000 g), тщательно удаляют спирт, подсушивают пробирку на воздухе для удаления паров спирта;

9) осадок ДНК растворяют в воде или ТЕ-буфере (0,01 М трис-HCl, pH 7,4, 0,1 мМ ЭДТА) до полного исчезновения осадка.

Проведенный ПЦР анализ с полученными по модифицированной методике образцами ДНК (рис. 4) позволяет говорить об отсутствии шмера и хорошей воспроизводимости результатов ПЦР, что, в свою очередь, свидетельствует о высоком качестве образцов ДНК и подтверждает эффективность усовершенствованной методики выделения.

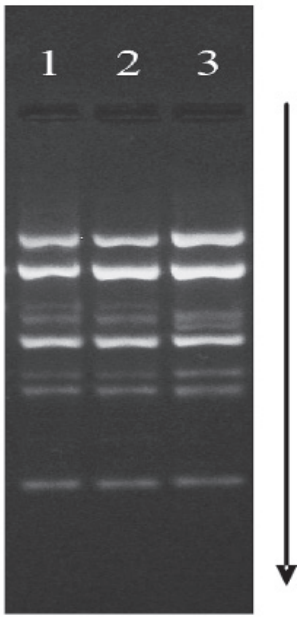

Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР рододендрона с использованием RAPD-праймера Oligo 29, где в качестве матрицы использовалась ДНК, полученная по модифицированной методике: 1, 2, 3 – номера повторностей

Заключение

Применение стандартной методики для выделения ДНК из растений представителей рода *Rhododendron* показало присутствие в полученных препаратах значительного количества примесей, а также деградацию ДНК, что было подтверждено результатами электрофореза и спектрофотометрически. Неполное удаление ингибиторов, полисахаридов и полифенолов приводит к угнетению последующих ферментативных реакций в процессе ПЦР и вызывает деградацию ДНК после длительного хранения. Для дальнейшего анализа данные препараты были непригодны.

С целью получения качественного препарата суммарной ДНК в стандартную методику выделения были внесены изменения и подобраны оптимальные временные, температурные и концентрационные условия, изменены некоторые этапы, что позволило в полной мере достичь поставленной цели.

Данная работа выполнена в рамках и при поддержке государственного контракта на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» № 16.518.11.7099 «Оценка состояния растительных ресурсов при интродукции в Центрально-Черноземном регионе и разработка мероприятий по их сохранению на базе ботанического сада им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского госуниверситета».

Список литературы

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. – М.: Мир, 1994. – С. 1558.

2. Баранов О.Ю., Каган Д.И. Микросателлитный анализ берёзы повислой // Молекулярная и прикладная генетика. – 2005. – Т. 1. – С. 157.

3. Боронникова С.В., Тихомирова Н.Н. Анализ генетической изменчивости популяций двух редких лекарственных видов рода Adonis с использованием ISSR-маркеров // Известия ТСХА. – 2008. – №1. – С. 86–94.

4. Остроумов Л.А., Просеков А.Ю., Архипов А.Н., Мудрикова О.В. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – Т. 12, №4 (3). – С. 722–724.

5. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. – Минск: Юнипол, 2007. –176 с.

6. Пташне М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг лямбда. – М.: Мир, 1989. – 160 с.

7. Фирсов Г., Холопова А. Рододендроны Северной столицы. // Цветоводство. – 2007. – № 4. – С. 26–29.

8. Edwards K., Johnstone C., Thomson C.A. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucleic Acids Res. – 1991. – Vol. 19. – P. 1349.

9. Lee H.C., Wei Y.H. Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging // Biogerontology. – 2001. – Vol. 2. – P. 231–244.

10. Poms R.E., Glossl J., Foissy H. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat // European Food Research and Technology. – 2001. – Vol. 213. – P. 361–365.

References

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Moscow: Mir, 1994. Vol. ??, pp. 1558.

2. Baranov O.Yu., Kagan D. I. *Mikrosatelitny analiz berezy povisloy* [Microsatellite analysis of weeping birch]. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika – Molecular and Applied Genetics*. 2005, Vol. 1, pp. 157.

3. Boronnikova S.V., Tikhomirova N.N. *Analiz geneticheskoy izmenchivosti populyaciy dvukh redkikh lekarstvennykh vidov roda Adonis s ispolzovaniem ISSR-markerov* [Analysis of genetic variability in populations of two rare species of medicinal Adonis using ISSR-markers]. *Izvestiya TSHA – Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy*, 2008, no.1, pp. 86–94.

4. Ostroumov L.A., Prosekov A.Yu., Arkhipov A.N., Mudrikova O.V. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk – Proceedings of Samara Scientific Center, Russian Academy of Sciences,* 2010, Vol. 12, no. 4(3), pp. 722–724.

5. Padutov V.E., Baranov O.Yu., Voropaev E.V. *Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza* [Methods of molecular genetic analysis]. Minsk: Yunipol, 2007. 176 p.

6. Ptashne M. *Pereklyuchenie genov. Regulyaciya gennoy aktivnosti i fag lyambda* [A genetic switch. Gene control and phage λ]. Moscow: Mir, 1989. 160 p.

7. Firsov G., Kholopova A. *Rododendrony Severnoy stolitsy* [Rhododendrons of the Northern Capital]. *Tsvetovodstvo – Floriculture*, 2007, no. 4, pp. 26–29.

8. Edwards K., Johnstone S., Thomson S.A. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.*, 1991, Vol. 19, p. 1349.

9. Lee H.C., Wei Y.H. Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology*, 2001, Vol. 2, pp. 231–244.

10. Poms R.E., Glossl J., Foissy H. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research and Technology*, 2001, Vol. 213, pp. 361–365.

Рецензенты:

Дурнова Н.А., д.б.н., доцент, зав. кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Саратов;

Полуконова Н.В., д.б.н., профессор кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 06.04.2012.