

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ ДНК

М.В. Пасовец, 5 курс

Научный руководитель – Е.М. Волкова, к.с./х.н., доцент

Научный консультант – Н.В. Водчиц, зав. НИЛ КТР

Полесский государственный университет

Введение. Выделение ДНК – важный шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие приложения, такие как амплификация, секвенирование, гибридизация не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот [8, с. 3].

Важно отметить что, именно ткани растений содержат большие количества белков, танинов и пигментов [1, с. 12], в частности, в растительных экстрактах голубики, малины и рододендрона содержится большое количество полифенолов и полисахаридов [3, с. 148; 5, с. 4; 6, с. 25].

Для того, чтобы получить высокоочищенные нуклеиновые кислоты, не содержащие примесей, необходимо использовать наиболее подходящие протоколы выделения [8, с. 3].

Цель работы: поиск метода выделения ДНК с высокой степенью ее очистки от примесей полифенолов и полисахаридов у голубики высокой, малины обыкновенной и рододендрона вечнозеленого.

Методика и объекты исследования. Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования “Полесский государственный университет” (далее БТФ ПолесГУ). В качестве исследуемых объектов использовали ткани (стебель и лист) голубики высокой, сортов Того, Bluegold, малины обыкновенной, сорта Polana, и рододендрона вечнозеленого. Данные растения были получены методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

Для выделения ДНК использовали три различные методики: протокол «ЦТАБ–PVP–меркаптоэтанол» [6, с. 26], методику Дорохова и модифицированную методику Дорохова, преобразованную ранее для получения нуклеиновых кислот из тканей малины [5, с. 5]. Во избежание ошибочных заключений проведено 3–кратное повторение процедуры выделения ДНК каждой методикой.

Измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза [6, с. 26].

Реакционная смесь с праймером UBC 845 для проведения ISSR–ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала стандартные компоненты [2, с. 116].

Результаты и их обсуждение. Метод выделения ДНК должен быть относительно простым, хорошо воспроизводимым и давать возможность быстрого получения достаточных количеств удовлетворительно очищенных препаратов ДНК [4, с. 2].

Мы применили и сравнили три протокола выделения нуклеиновых кислот из растительных тканей. В таблице 1 приведены спектрофотометрические данные исследования чистоты и концентрации ДНК образцов.

Таблица – Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК (средние значения)

Растительный объект	ЦТАБ–PVP–меркаптоэтанол		Методика Дорохова		Методика Дорохова с модификациями	
	конц.	очистка	конц.	очистка	конц.	очистка
Того (L)	53.6	2.07	54.4	2.13	10.7	1.73
Того (S)	140.7	1.86	38.1	1.98	76.1	1.74
Bluegold (L)	73.4	1.77	21.0	2.21	24.7	1.84
Bluegold (S)	41.3	1.89	28.1	1.92	51.3	1.61
Малина (L)	154.3	1.96	128.8	1.24	23.8	1.85
Малина(S)	38.1	1.84	86.7	1.55	53.4	1.94
Рододендрон (L)	21.0	1.78	15.6	1.24	28.9	1.86
Рододендрон (S)	59.8	1.76	31.0	1.64	44.1	1.79

Применяя методику «ЦТАБ–PVP–меркаптоэтанол» удалось получить ДНК хорошей очистки для всех растений. Наиболее высокая концентрация ДНК для голубики составила: из листа – 73.4 нг/мкл (сорт Bluegold); из стебля – 140.7 нг/мкл (сорт Того). Для малины концентрация ДНК, выделенной из листа, значительно выше, чем из стебля и составляет соответственно 154.3 нг/мкл и 38.1 нг/мкл. У рододендрона же наоборот 21 нг/мкл из листа и 59.8 нг/мкл из стебля.

Анализируя средние данные по итогу трех выделений ДНК второй методикой (методика Дорохова), можно отметить, что из растительных тканей сортов голубики удалось получить ДНК высокой очистки 1.92 – 2.21, но концентрации нуклеиновой кислоты составляли от 21.0 нг/мкл (сорт Bluegold из листа) до 54.4 нг/мкл (сорт Того из листа). ДНК малины отличается относительно вы-

сокой концентрацией, но при этом низкой степенью очистки. Концентрации ДНК, выделенной из тканей рододендрона, невелики и варьируют от 15.6 нг/мкл у листа, до 31.0 нг/мкл у стебля. При этом очистка ДНК из стебля лучше, чем из листа.

ДНК, выделенная из растительных тканей голубики, третьей методикой (модифицированной методикой Дорохова) имеет невысокие концентрации: максимальную – 76.1 нг/мкл (сорт Того из стебля), минимальную – 10.7 нг/мкл (сорта Того из листа), очистка 1.61 – 1.84. У малины обыкновенной, не смотря на то, что значение концентрации ДНК, выделенной из листа, в два раза меньше чем из стебля, степень очистки достаточно хорошая в обоих случаях. Концентрация ДНК, выделенной из листа рододендрона, составляет 28.9 нг/мкл, а из стебля – 44.1 нг/мкл, при этом степень очистки лежит в пределах допустимого.

После проведения ISSR–ПЦР–реакций с ДНК, выделенной методикой Дорохова и модифицированной методикой Дорохова, на электрофореграммах визуализировались от одного (из стебля малины) до трех (из листа и стебля голубики) фрагментов. После ПЦР–анализа с ДНК–матрицей, выделенной протоколом «ЦТАБ–PVP–меркаптоэтанол», можно было наблюдать от 7 до 11 маркеров на каждом профиле [7, с. 18].

Выводы. По результатам исследования можно сделать вывод, что протокол «ЦТАБ–PVP–меркаптоэтанол» подходит для выделения чистой ДНК из стебля и листа всех выбранных объектов, а так же пригодной для дальнейшего использования в ПЦР–анализе, о чем свидетельствуют результаты электрофореграммы.

Выделенная ДНК из растительных тканей малины обыкновенной и рододендрона вечнозеленого с помощью протокола Дорохова и модифицированной методики Дорохова, отличалась невысокой очисткой и оказалась непригодной для проведения дальнейших молекулярно–генетических анализов. Несмотря на то, что в случае голубики высокой, с помощью обеих методик удалось получить ДНК относительно хорошей очистки и концентрации, полученные ПЦР–профили, оказались неинформативными.

Список использованных источников

1. Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано– и биомед. технол. / В.А. Великов. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.
2. Водчиц, Н.В. Применение ISSR–маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н.В. Водчиц // Весці НАНБ. Сер. біял. Навук. – 2016. – № 3.– С. 115–120.
3. Калаев, В.Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В.Н. Калаев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 148–152.
4. Качановский, Е. А. Методические рекомендации к выполнению работ по курсу “Биофизический практикум”/ Е.А. Качановский, В.Л. Ушаков. – Москва, 2002. – 11 с.
5. Соболев, В. В. Использование метода полимеразной цепной реакции для генетического маркирования ремонтантной малины: автореф. дис... к. б. н. / В.В.Соболев – Москва, 2004. – 18 с.
6. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н.В. Водчиц [и др.] // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2014. – № 2. – С. 25–30.
7. Сравнительный ISSR–ПЦР–анализ ДНК растений, выделенной протоколом ЦТАБ–PVP–меркаптоэтанол / Н.В. Водчиц [и др.] // Опыт и перспективы возделывания ягодных растений семейства Брусничные на территории Беларуси и сопредельных стран: материалы Международного научно–практического семинара – Минск: Медисонт, 2017. – С. 15–22.
8. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О.С. Антонова [и др.] // Научное приборостроение. – 2010. – том 20. – № 1. – С. 3–9.