

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ОБЩЕЙ ГЕНОМНОЙ ДНК ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ И ПОДБОР УСЛОВИЙ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ISSR–ПЦР

***Н.В. ВОДЧИЦ, И.О. ЗАЙЦЕВА, И.Г. КИРИКОВИЧ,
Е.О. ЮРЧЕНКО, А.А. ВОЛОТОВИЧ***

*Полесский государственный университет
г. Пинск, Республика Беларусь, vodna76@mail.ru*

Введение. Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) является коммерчески важной культурой как ценное пищевое и лекарственное растение и успешно возделывается в странах Северной Америки и Европы. В связи с высокой актуальностью культуры, возникновением нового направления в нашей стране – промышленного голубиководства, – а так же высокой востребованностью и эффективностью фармакологических субстанций из растительного сырья голубики состоит задача строгой сертификации коллекционного и посадочного материала и коллекций *in vitro* на основе современных молекулярно–биологических и генетических методов, разработки методологии проведения анализа и его стандартизации [1].

В настоящее время все большее значение приобретают методы, основанные на выяснении изменчивости последовательностей ДНК [2].

Существует много различных протоколов выделения ДНК, которые отличаются модификация-ми методов разрушения клеточной стенки, лизиса и очистки ДНК и требуют разное количество рабочего времени [3]. Растения разных видов характеризуются различными физиологическими и биохимическими особенностями, присутствием различных веществ, создающих примеси в препаратах нуклеиновых кислот (полисахаридов, танинов, полифенолов и их хинон–окисленных продуктов). Физико–химические свойства подобных веществ в определенной степени совпадают со свойствами нуклеиновых кислот, что затрудняет их полное отделение от ДНК и в дальнейшем препятствует полимеразной цепной реакции [2].

Целью наших исследований являлся сравнительный анализ методов выделения ДНК из растительных тканей трех сортов голубики высокорослой с целью выявления наиболее продуктивного метода, а также изучение влияния концентраций ионов магния, дезоксирибонуклеотидов и ДНК-матрицы на выход ПЦР-продукта из растительного сырья тех же трех сортов голубики высокорослой.

Материал и методы исследований. Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования “Полесский государственный университет” (далее БТФ ПолесГУ) в 2014 году.

Использовали ткани разных органов растений (стебель и лист) сортов ‘Reka’, ‘Northblue’, ‘Bluesgor’ голубики высокорослой, произведенных методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ, прошедших адаптацию и доращивание до четырехлетнего возраста на базе тепличного комплекса унитарного предприятия “Плантарум” (д. Добрая воля Пинского района).

ДНК выделяли двумя способами: по методу Ли и соавторов [4] и по методу Демпстера и соавторов [5]. Точное измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике по объему 1,5 мкл полученного экстракта в 1–3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм. Коэффициент поглощения пересчитывался на толщину слоя жидкости 10 мм.

ПЦР-ISSR проводили с использованием праймера UCB 818, в 25 мкл смеси, содержащей в первом случае 10× ПЦР-буфер, 50 мМ MgCl₂ в диапазон концентраций 1–5 мМ, 10 мМ смеси дНТФ, 13.4 пм праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. Таq ДНК полимеразы.

Во втором случае 10× ПЦР-буфер, 50 мМ MgCl₂, 10 мМ смеси дНТФ в диапазон концентраций 100–200 мкМ, 13.4 пм праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. Таq ДНК полимеразы.

В третьем случае 10× ПЦР-буфер, 50 мМ MgCl₂, 10 мМ смеси дНТФ, 13.4 пм праймера, ДНК-матрицу в диапазон концентраций 10–50 нг, 2 ед. Таq ДНК полимеразы (все производства PrimeTech, Беларусь, за исключением dNTP-mix производства Carl Roth, Германия). Реакцию проводили на термоциклере Biometra (Германия) в течение 3-х часов. Для ISSR-ПЦР применялась следующая программа: 94°C 30 с; 40 циклов: 94°C 1 мин, 50°C 1 мин, 72°C 1 мин; 72°C 5 мин.

Длину фрагментов выделенной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза экстракта в количестве 6 мкм с загрузочным красителем состава бромфеноловый синий + глицерин, в количестве 2 мкм., наносимых в 2% агарозный гель, в трис-боратном (ТБЕ-) и трис-ацетатном (ТАЕ-) буферах, при стартовом напряжении 90 В и основном напряжении фореза от 50 В, в течение 50 мин. Окраска ДНК осуществлялась бромистым этидием, вносимым в гель в концентрации 5 мкг/мл, до застывания геля. Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель-документирования Quantum ST4.

Результаты и их обсуждение. В исследованиях были применены и сравнивали две модификации ЦТАБ метода. Оба протокола выделения ДНК из растений рода *Vaccinium* занимают в среднем 4–5 часов. В обоих случаях в ходе выделения ДНК использовали одни и те же реагенты. В двух случаях мы получили осадки разного цвета: коричневого цвета ДНК, полученную методикой по Li & al., 2007 [4] и белого цвета ДНК, полученную протоколом Dempster & al., 1999 [5].

Необходимо отметить, что поливинилпирролидон использовали для связывания полифенольных соединений и меркаптоэтанола, а также для удаления желтой и коричневой окраски препаратов ДНК. Но осадок, полученный протоколом по Li & al., 2007 [4], остался окрашенным в коричневый цвет. Анализ ДНК, полученной протоколом по Li & al., 2007 [4] показал, что соотношение поглощения при 260/280 нм, в среднем, было равно 1.47. Это свидетельствует о том, что полученные образцы ДНК содержат примеси. Самая высокая концентрация выделенной ДНК равнялась 41.9 нг/мкл, а минимальная – 4.6 нг/мкл. Возможно поливинилпирролидон и меркаптоэтанол, которые входят и в лизис-буфер и в промывочный буфер, из-за высокой концентрации приводят к деградации ДНК.

В свою очередь образцы ДНК, полученной методикой Dempster & al., 1999 [5], имели соотношение поглощения при 260/280 нм равное, в среднем, 1.85. При этом наивысшая концентрация ДНК равна 170.2 нг/мкл, а наименьшая – 50.8 нг/мкл.

В первом случае пик поглощения приходился на длину волны 225–230 нм. При исследовании всех шести образцов пик приходился на эту длину волны. Согласно литературным источникам, УФ-спектры фенольных соединений характеризуются двумя максимумами поглощения 215–220 нм с плечом в области 230–240 нм и 325–330 нм с плечом в области 295–300 нм [6]. Так же можно

предположить, что в растворе есть примеси ГКК (гидроксикоричных кислот), которые присутствуют в растениях рода *Vaccinium* и имеют несколько максимумов поглощения: при 220–230 нм и 320–330 нм. Для р-кумаровой кислоты характерно наличие двух максимумов поглощения в УФ-спектре – при 225–230 нм и 308–313 нм [7]. Во втором случае – пик поглощения находился на длине волны равной 260 нм. Это говорит о том, что исследуемые образцы удовлетворяют требованиям очистки ДНК.

Изучали влияние концентрации ионов магния на продукты ISSR–ПЦР. Для 25 мкл реакционной смеси нами были взяты пять вариантов концентрации 50мМ MgCl₂. При концентрации 1мМ выход продукта не наблюдается вовсе. Далее наблюдается эффект увеличения числа фрагментов при концентрациях 1,5мМ, 2,0мМ, 2,5мМ и опять снижение при концентрации 5,0 мМ. При концентрации 2мМ более яркая производимость фрагментов, но количество их меньше, чем при концентрации 2,5мМ, вероятно увеличивается выход неспецифических продуктов.

При изучении влияния концентрации дНТФ на продукты ISSR–ПЦР удалось выяснить, что лучший выход продукта наблюдается при концентрации 125 мкМ. Повышение концентрации привело к пониженному выходу ПЦР–продукта. Так же мы применили разные концентрации ДНК (10–50нг). Наблюдалась хорошая воспроизводимость полос при концентрациях 10 нг и 20 нг, но наиболее яркий фрагмент при концентрации 20нг. При дальнейших вариантах концентрации фрагменты выражены слабо.

Выводы. Работа с *V. corymbosum* показала биохимическую «проблемность» рода *Vaccinium* как носителя большого количества веществ, ингибирующих ПЦР в недостаточно очищенных экстрактах ДНК. Сравнительный анализ выбранных методов экстракции ДНК показал, что устранение ингибирующих веществ достигается с помощью протокола по Dempster & al. (1999), который можно условно назвать «протокол СТАВ–PVP–меркаптоэтанол для растений с высоким содержанием полифенолов и полисахаридов».

В результате работы, нами были установлены оптимальные условия для проведения полимеразной цепной реакции для *Vaccinium corymbosum*, которые обеспечивают максимальный выход ПЦР–продукта.

В случае с подбором ионов магния самой результативной была концентрация 2,0 и 2,5 мМ. При концентрации 2мМ наблюдался достаточно информативный ISSR–профиль, но с меньшим количеством фрагментов, чем при концентрации 2,5мМ.

При исследовании концентрации дНТФ мы выяснили, что наибольшее количество ISSR–фрагментов наблюдалось при добавлении в реакционный объём 125 мкМ смеси четырёх дезоксирибонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спиридович Е. В. Молекулярные маркеры в таксономии и сохранении генетических ресурсов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) / Е. В. Спиридович, А. Б. Власова, А. Н. Юхимук, Л. В. Гончарова, Е. Д. Агабалаева, Е. Н. Решетников // Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран: материалы междунаучно-практической конференции. Минск, 17–18 июля. 2014 г./ Центр. бот. сад НАН Беларуси, редкол.: В.В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2014. — С.101–108.
2. Калаев В.Н., Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В.Н. Калаев, О.А. Землянухина, И.Ю. Карпеченко, К.А. Карпеченко, А.М. Кондратьева, В.Н. Вепринцев, Н.А. Карпеченко, С.С. Карпова // Фундаментальные исследования. – 2012. – №5. – С. 148–152.
3. Юрченко Е. О., Синявская М. Г. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК: практическое руководство/ Е.О. Юрченко, М. Г. Синявская; Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск, 2007. – 101с.
4. Li J.T., Yang J., Chen D.C., Zhangand X.L., Tang Z.S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower // Genetics and Molecular Research. – 2007. – V. 6. – P. 1064–1071.
5. Dempster E.L., Pryor K.V., Francis D., Young J. E., Rogers H.J. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses // Biotechnique. – Vol. 27, № 1. – 1999. – P. 66–68.
6. Верниковская Н. А., Темердашев З.А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном //Аналитика и контроль. – 2012. – Том 16. – №2. – С. 188–195.
7. Медведев Ю. В. Исследование содержания фенолоксилов в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ: дис. ... канд. фармацевт. наук: 14.04.02 /Ю. В. Медведев. – Москва, 2010. – 143 л.