

БИОЛОГИЯ

УДК 57.088.2+58.088

Бадулина И.А., Мартынов В.В.

Московский государственный областной университет

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА НА КАЧЕСТВО ВЫДЕЛЯЕМОЙ ИЗ НЕГО ГЕНОМНОЙ ДНК

Аннотация. Представлены результаты экспериментов по сравнительной оценке различных способов сохранения растительного материала до момента выделения из него ДНК, в которых основным критерием оценки являлась пригодность полученного препарата ДНК для использования в ПЦР. На основании полученных результатов было сделано заключение, что при всех исследованных способах сохранения растительного материала получаемый препарат ДНК обладает хорошей амплификационной способностью. При этом наиболее оптимальным с практической точки зрения можно считать способ сохранения растительного материала в виде обычного гербария.

Ключевые слова: растительный материал, ДНК, ПЦР.

I. Badulina, V. Martynov

Moscow State Regional University

EFFECT OF VARIOUS METHODS OF PRETREATMENT OF PLANT MATERIAL ON THE QUALITY OF GENOMIC DNA ISOLATED FROM IT

Abstract. We present the results of the experiments on the comparative evaluation of the efficiency of various methods for preservation of plant material until DNA isolation from it. The main criterion for this evaluation was applicability of obtained DNA samples for PCR amplification. Based on these results it was concluded that all tested method allowed one to obtain the DNA samples having good PCR applicability. However, from practical point of view the method for preservation of plant material in the form of conventional herbarium should be considered as the most optimal.

Key words: plant material, preservation, DNA isolation, PCR.

Для успешного применения молекулярных технологий в различных областях биологии необходимо высокое качество препарата нуклеиновых кислот (НК). Материал, из которого про-

изводится выделение НК, оказывает решающее влияние на это качество, и, следовательно, на достоверность и воспроизводимость результатов, получаемых с помощью молекулярно-биологических методов исследования,

© Бадулина И.А., Мартынов В.В., 2014.

в частности методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Растительный материал является достаточно проблематичным видом материала с точки зрения выделения ДНК, и принято считать, что лучше всего выделять ДНК из молодых свежих листьев растений [2; 3; 4]. Однако это условие не всегда удается выполнить. Например, при работе с полевым материалом, из которого нельзя выделить ДНК непосредственно после сбора. Таким образом, возникает проблема сохранения этого материала до момента выделения из него препарата ДНК. С учетом вышеизложенного целью настоящей работы было проведение сравнительной оценки эффективности сохранения растительного материала до момента выделения из него ДНК различными способами, где основным критерием оценки являлась пригодность полученного препарата ДНК для использования в ПЦР.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве растительного материала были использованы листья трехнедельного растения картофеля (*Solanum tuberosum*) сорта Жигулевский. В эксперименте исследовались образцы, подвергнутые 7 различным способам предварительной обработки:

1) свежие листья без какой-либо обработки, взятые в качестве положительного контроля (сокращённое обозначение СВ);

2) листья, высушенные при температуре окружающей среды между слоями фильтровальной бумаги в течение 1 недели (гербарий) (сокращённое обозначение Гб);

3) листья, высушенные в термостате при температуре 50 °С в течение

ночи непосредственно после сбора (сокращённое обозначение С50);

4) листья, высушенные в термостате при температуре 50 °С в течение ночи через 3 часа после сбора (сокращённое обозначение СК);

5) листья, помещённые на сутки в 96%-этанол (сокращённое обозначение Э);

6) листья, помещённые на сутки в лизирующий раствор 1 из набора для выделения растительной ДНК SILICA plant (Компания Биоком) (сокращённое обозначение Л1);

7) листья, помещённые на сутки в лизирующий раствор 2 из набора для выделения растительной ДНК SILICA plant (Компания Биоком) (сокращённое обозначение Л2).

Выделение ДНК. Геномную ДНК из образцов выделяли при помощи набора реагентов «SILICA plant» производства ООО «Компания Биоком» по протоколу фирмы производителя. Геномную ДНК из каждого образца выделяли в двух повторностях (обозначенные 1 и 2, соответственно).

Определение качества ДНК. Выход ДНК и её качество оценивали спектрофотометрически при длинах волн 260 и 280 нм. Также качество ДНК определяли по её пригодности для ПЦР амплификации. Для этого препараты геномной ДНК амплифицировали с праймерами, специфичными по отношению к различным участкам генома картофеля. С праймерами ActF и ActR амплифицировали фрагмент высококопийного гена актина, с парами праймеров R1F и R1R и R3F и R3R амплифицировали фрагменты низкокопийных генов устойчивости картофеля к фитофторозу R1 и R3, соответственно, и праймер OPL18 представлял собой

RAPD-маркер, специфичный к случайным областям в растительном геноме (табл. 1).

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании изучалось влияние на количественный выход ДНК способа сохранения растительного образца. Ниже приво-

дятся значения концентрации ДНК в исследуемых препаратах (табл. 2): наибольший выход ДНК был получен для образцов, подвергнутых ускоренной сушке С50 (в среднем 82,5 нг/мкл) и СК (в среднем 76 нг/мкл), из образцов, высушенных при температуре окружающей среды (Гб), было выделено наименьшее количество ДНК (в среднем 40 нг/мкл), образцы, подвергнутые

Таблица 1

Информация о праймерах, использованных для анализа амплификационной способности препаратов ДНК

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига
ActF ActR	5r-CAGCAACTGGGATGATATGG-3r 5r-ATTTTCGCTTTTCAGCAGTGGT-3r	55°C
R1F R1R	5r-CACTCGTGACATATCCTCACTA-3r 5r-CAACCCCTGGCATGCCACG-3r	55°C
R3F R3R	5r-TCCGACATGTATTGATCTCCCTG-3r 5r-AGCCACTTCAGTTCTTACAGTAGG-3r	64°C
OPL18	5r-ACCACCCACC-3r	55-35°C (touch down)

Таблица 2

Концентрация ДНК в образцах, определенная спектрофотометрически при длине волны 260 нм, и соотношение оптических плотностей при длинах волн 260 и 280 нм

№	Образец	Концентрация нг/мкл	260/280
1	CB1	52	1,50
2	CB2	54	1,66
3	Гб1	38	2,50
4	Гб2	42	2,10
5	С50.1	95	1,9
6	С50.2	70	2,22
7	СК1	82	2,0
8	СК2	70	3,1
9	Э1	83	1,63
10	Э2	57	2,1
11	Л1.1	84	1,68
12	Л1.2	57	2,64
13	Л2.1	61	2,21
14	Л2.2	45	2,5

консервации в жидкостях (Э, Л1, Л2), заняли по этому показателю промежуточное положение. Такие результаты согласуются с имеющимися в литературе данными, согласно которым образцы, высушенные при температуре выше 42°C, содержат большее количество высокомолекулярной ДНК [1].

Важным показателем качества препарата геномной ДНК является также соотношение оптических плотностей образца при длинах волн 260 и 280 нм. Это соотношение характеризует чистоту препарата ДНК, и желательнее, чтобы оно не превышало 2. По этому показателю препараты ДНК, полученные из прошедших предварительную обработку образцов, оказались заметно хуже препаратов ДНК, полученных

из свежих листьев (табл. 2), что подтверждает предпочтительность использования для выделения ДНК свежего материала.

Тем не менее, основным критерием качества выделенной ДНК в данном исследовании являлась её амплификационная способность в ПЦР. Для определения этой способности препараты геномной ДНК амплифицировали с вышеуказанными праймерами. Результаты ПЦР представлены на рис. 1 (а – г). Все исследуемые препараты ДНК обладали практически одинаковой амплификационной способностью, т.е. с каждым из них в ходе ПЦР были получены продукты амплификации ожидаемой длины и в детектируемом количестве. Эти специфичные про-

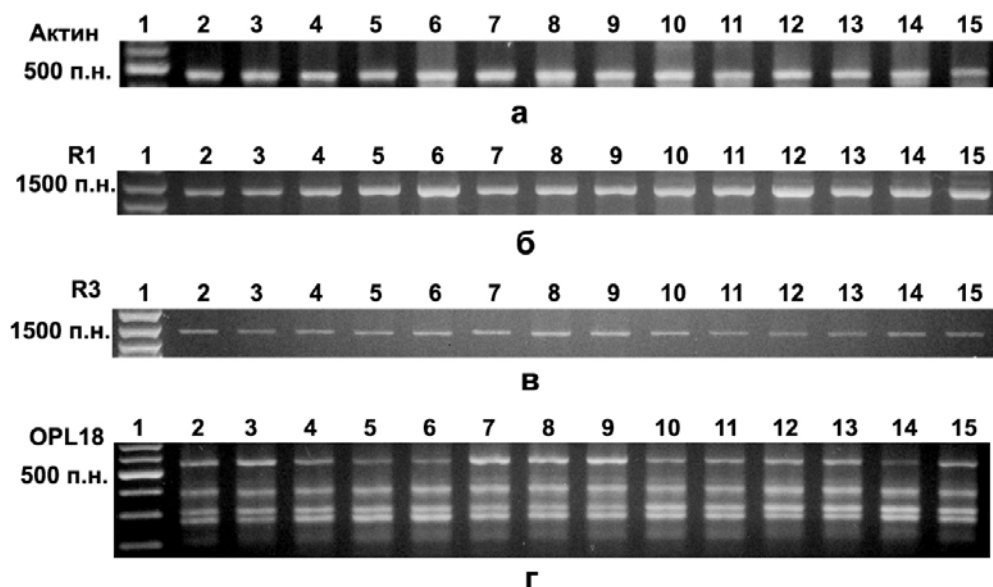


Рис. 1. Результаты ПЦР амплификации ДНК исследуемых образцов с праймерами, специфичными по отношению к различным участкам генома картофеля. а – с праймерами ActF и ActR (Актин); б – с праймерами R1F и R1R (R1); в – с праймерами R3F и R3R (R3); г – с праймером OPL18 (OPL18). 1- Маркер молекулярной массы, 2- СВ1, 3- СВ2, 4- ГБ1, 5- ГБ2, 6- С50.1, 7- С50.2, 8- СК1, 9- СК2, 10- Э1, 11- Э2, 12- Л1.1, 13- Л1.2, 14- Л2.1, 15- Л2.2.

дукты амплификации были получены как для высококопийных последовательностей генома (рис. 1 а), так и для низкокопийных последовательностей (рис. 1 б и в), кроме того во всех образцах, амплифицированных с RAPD-праймером OPL18, был получен одинаковый набор фрагментов (рис. 1 г). Полученные в ПЦР анализе результаты свидетельствуют о хорошей сохранности ДНК во всех препаратах, её преимущественно нативном состоянии и, следовательно, о пригодности всех образцов для ПЦР амплификации.

Таким образом, способы экспресс-сушки растительного материала обеспечивают самый большой выход ДНК, а выделение ДНК из свежих листьев позволяет получить препарат более высокого качества, но поскольку при всех способах сохранения растительного материала был получен препарат ДНК, обладающий хорошей амплифи-

кационной способностью, то наиболее оптимальным с практической точки зрения можно считать способ сохранения растительного материала в виде обычного гербария, так как он является наиболее простым и незатратным.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Звягин А.С. Выделение ДНК из гербарных листьев *Vitis vinifera* L. // Научный журнал КубГАУ. – 2010. – № 58. – С. 1–12.
2. Guidet. F. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses // Nucl. Acids Res. – 1994. – V. 22 (№ 9). – P. 1772–1773.
3. Junghans H., Metzloff M. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA // BioTechniques. – 1990. – № 8. – P. 176.
4. Stewart C.N.Jr., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // BioTechniques. – 1993. – V. 14. – P. 748–749.