

УДК 575:582.746.56

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ЕКСТРАГУВАННЯ ТА АМПЛІФІКАЦІЇ ДНК ГІРКОКАШТАНІВ (РІД *AESCVLUS L.*) ISSR-МЕТОДОМ

К.Є. ШАВАНОВА,¹ Д.О. КИСЕЛЬОВ,¹ Т.М. ЧЕЧЕНЄВА^{1, 2}

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України
03041 Київ, вул. Героїв Оборони, 15

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Здійснено порівняльний аналіз різних методів, умов екстрагування та ампліфікації ДНК п'яти видів гіркокаштана (*Aesculus L.*). Підібрано мікросателітні праймери з ди- і тринуклеотидними мотивами для подальшого використання при уточненні їх систематичного положення.

Ключові слова: *Aesculus L.*, ДНК, екстрагування, ампліфікація.

Рід Гіркокаштан — *Aesculus L.* належить до відділу Покритонасінні — Magnoliophyta (*Angiospermae*), класу Дводольні — *Magnoliopsida*, порядку Сапіндоцвіті (Сапіноцвіті) — *Sapindales*, родини Гіркокаштанові — *Hippocastanaceae* Tagg. Et Gray [4]. Разом з тим у науковій літературі досі є істотні розходження як у поділі на роди, так і в кількості видів [2, 7, 11], що потребує ретельного перегляду систематики родини Гіркокаштанові. Адекватно це можна зробити із застосуванням сучасних молекулярно-генетичних методів. Для маркування геному рослин розроблено й широко використовують різні типи молекулярних маркерів. Вони дають змогу провести ідентифікацію та паспортизацію сортів і гібридів, виявити філогенетичні зв'язки між видами [5, 6].

Головним критерієм для отримання вірогідних даних є чистота вихідної ДНК, тобто вона має бути вільною від інгібіторів ферментативної активності Таq-полімерази, а саме: білків, поліфенолів, полісахаридів, поліксилолів, ізопропанолу, хлориду натрію. Чистота нуклеїнової кислоти залежить від методу екстрагування (детергент для лізису, агент преципітації) [1].

За міжнародними стандартами, до методів екстрагування ДНК ставляться такі вимоги [14, 15]:

- 1) застосовуваність методу — можливість застосування певного методу для чітко дібраних аналітів, матриць, необхідних концентрацій;
- 2) доступність — простота використання, відтворюваність та ефективність, найменша собівартість;
- 3) середній лінійний розмір нативної молекули ДНК;
- 4) структурна цілісність;
- 5) хімічна чистота екстрагованої ДНК;
- 6) концентрація ДНК;
- 7) стан фрагментації ДНК.

Метою досліджень був порівняльний аналіз різних методів, умов екстрагування й ампліфікації ДНК гіркокаштанів, підбір праймерів для подальшого використання в молекулярно-генетичному аналізі для уточнення їх систематичного положення.

Методика

Дослідження проводили на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України протягом 2007—2008 рр. Вихідним матеріалом для експериментів слугували 7—10-добові етіольовані пагони п'яти видів гіркокаштана (*Aesculus* L.): гіркокаштани звичайний, восьми-тичинковий, забутий, дрібноквітковий, голий.

Дослідження виконували трьома методами екстрагування ДНК з порівнянням їх за такими параметрами: кінцева концентрація ДНК в розчині, наявність домішок, розмір молекули нативної ДНК. З літературних даних відомо, що лізат клітин деревних культур характеризується високим вмістом поліфенолів, що не відповідає вимогам проведення ПЛР [1, 3].

Перший метод екстрагування ДНК передбачає використання цетилетиламоній броміду (ЦТАБ) [8]. Зразки (0,1 г тканини) гомогенізували у ступці зі 100 мкл ЦТАБ-буфера. Після цього додавали ще 500 мкл цього буфера, який містив 20 мМ динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), 100 мМ *трис*-HCl (pH 8,0), 1,4 М NaCl, 2 % ЦТАБ та 2 % полівінілпіролідону (ПВП) й інкубували протягом 1 год за температури 65 °С. Суміш екстрагували таким самим об'ємом фенолу і двічі — таким самим об'ємом суміші хлороформ : ізоаміловий спирт (24 : 1 за об'ємом). Далі з водної фази осаджували ДНК одним об'ємом ізопропілового спирту. Зразки витримували 1 год за температури 20 °С, після чого центрифугували 15 хв при 14 000 g (центрифуга Micro22R ETTICHN). Осад промивали 70 %-м етанолом і розчиняли в деіонізованій воді.

Другим був метод лужного лізису [13]. Зразки (0,1 г тканини) розтирали у ступці з додаванням 700 мкл 10 М гідроксиду натрію (NaOH) та інкубували 20 хв за температури 65 °С. Після цього суміш центрифугували 15 хв при 14 000 g і відбирали водну фазу, в якій були розчинені нуклеїнові кислоти.

Третій метод — сорбція ДНК на оксиді силіцію (SiO₂) [10]. Зразки розтирали у ступці з додаванням 1 мл лізувального буфера, який містив 100 мМ *трис*-HCl (pH 8,0), 50 мМ ЕДТА (pH 8,0), 500 мМ хлориду натрію (NaCl + 0,07 % 2-меркаптоетанола), додавали 130 мкл 10 %-го натрію додецилсульфату (ДСН) й інкубували 15 хв за температури 65 °С. Для преципітації білків додавали 300 мкл ацетату калію (CH₃COOK) й інкубували протягом 30 хв на льоду. Центрифугували 5 хв при 7000 g, потім 300 мкл надосадової рідини відбирали в іншу пробірку, додавали 900 мкл 5 М йодиду натрію (NaI), 20 мкг SiO₂ та інкубували за кімнатної температури протягом 5 хв. Центрифугували 5 хв при 7000 g, зливали водну фазу, осад двічі промивали етанолом, підсушували, додавали деіонізовану воду, інкубували протягом 5 хв за 50 °С, знову центрифугували 5 хв при 7000 g і зливали водну фазу, яка була розчином ДНК.

Розмір нативної ДНК аналізували методом електрофорезу в 0,8 %-му агарозному гелі, що містив 0,5 мкг/мл бромистого етидію в однократному TBE-буфері за напруги 3—4 В/см протягом 4—5 год.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ

ТАБЛИЦЯ 1. Мікросателітні праймери, використані в дослідженні

Номер	Назва	Послідовність	Довжина нуклеотиду
1	ISSR 3-4	(ACC)6C	19
2	ISSR 3-5	(GTC)7A	22
3	ISSR 3-6	(AGC)6C	19
4	ISSR 3-7	(GTG)7C	22
5	ISSR 3-8	(CTC)6C	19
6	ISSR 2-9	(AC)9C	19
7	ISSR 2-10	(TG)9A	19
8	ISSR 2-11	(AC)9T	19
9	ISSR 2-12	(AC)9C	19
10	ISSR 2-13	(GA)9C	19

У дослідженнях використано 10 мікросателітних праймерів (ISSR-праймери), які наведені в табл. 1.

Результати та обговорення

Для отримання високоспецифічних спектрів ампліфіконів потрібно підібрати відповідні умови ампліфікації (температура відпалу праймерів, кількість циклів, тривалість циклів) та концентрацію іонів магнію [9].

Оптимальну температуру відпалу праймерів розраховували за формулою, запропонованою Ричликом [12]:

$$T_a^{пр} = 0,3T_M^{пр} + 0,7T_M^{прод} - 14,9,$$

де $T_a^{пр}$ — оптимальна температура відпалу праймера; $T_M^{пр}$ — температура плавлення праймера; $T_M^{прод}$ — температура плавлення продуктів ПЛР.

Температуру плавлення праймера за стандартних умов визначали за формулою

$$T_M^{пр} = -K(dG/l_0^{3,3/13}),$$

де $K = 2,913682$, якщо концентрація іонів K^+ в розчині 50 мМ; l_0 — довжина олігонуклеотиду в нуклеотидах.

За першим методом екстрагування ми отримали розчин із концентрацією ДНК 2,5—2,7 мкг/г тканини, великого розміру фрагменти (40—50 тпн) з незначним забрудненням, що не інгібує ПЛР.

За екстрагування другим методом концентрація ДНК в розчині становила до 2,0 мкг/г тканини із фрагментами невеликого розміру (1—5 тпн), вона була сильно забруднена поліфенолами і пігментами, які є інгібіторами, що не відповідає вимогам проведення ПЛР.

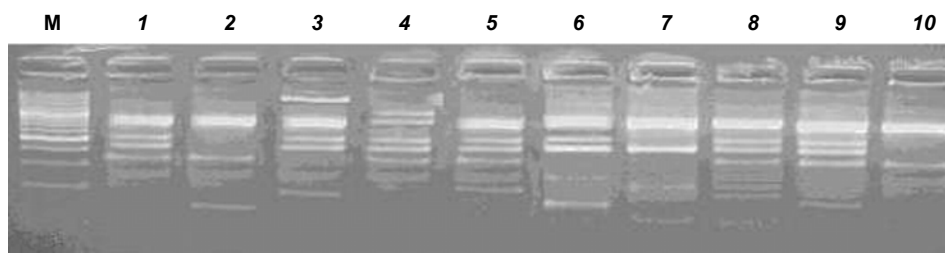
За третього методу екстрагування концентрація ДНК в розчині була невисокою (до 0,5 мкг/г тканини), розмір фрагментів невеликий (2—7 тпн), забрудненість поліфенолами, які частково інгібують ПЛР і впливають на вірогідність аналізу — середня (табл. 2).

Оптимальну концентрацію іонів магнію визначали емпірично, починаючи від 2 до 4 мМ. Кращою для ПЛР виявилась концентрація 3,5 мМ $MgCl_2$.

Після добору умов проведено ампліфікацію в 25 мкл реакційної суміші, яка складалась із 10 мМ *trис*-HCl, 50 мМ KCl, 3,5 мМ $MgCl_2$,

ТАБЛИЦЯ 2. Основні параметри ДНК, виділеної різними методами

Параметр/метод	ЦТАБ	Лужний лізис	Сорбція на оксиді силіцію
Застосовуваність методу	+	+	+
Доступність	+	+	+
Середня довжина нативної молекули ДНК	40—50 тпн	1—5 тпн	2—7 тпн
Хімічна чистота екстрагованої ДНК	Відносно чиста	Наявні домішки, інгібітори ферментативної активності Таq-полімерази	Наявні домішки
Концентрація ДНК, нг/мкл	250	200	50
Стан фрагментації ДНК	Нефрагментована	Фрагментована	Фрагментована



Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гіркокаштанів (рід *Aesculus* L.) з праймерами ISSR 3-4 та ISSR 3-8:

М — маркер молекулярних мас; 1, 6 — гіркокаштан звичайний; 2, 7 — гіркокаштан восьмитичинковий; 3, 8 — гіркокаштан забутий; 4, 9 — гіркокаштан дрібноквітковий; 5, 10 — гіркокаштан голий

2 мМ кожного дезоксинуклеозидтрифосфату, 0,2 мкл праймера, 1 од. акт. Таq ДНК-полімерази та 100—120 нг ДНК. Умови ПЛР для динуклеотидних праймерів передбачали початкову денатурацію за 95 °С — 5 хв і послідовно 35 циклів: 95 °С — 30 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 2 хв 30 с. Кінцева елонгація за 72 °С — 7 хв. Для тринуклеотидних праймерів умови ампліфікації були ті ж самі за винятком температури відпалу — 58 °С, а для праймерів ISSR 3-5 та ISSR 3-7 — 60 °С.

На рисунку наведено електрофореграму продуктів ампліфікації ДНК 5 видів гіркокаштана (рід *Aesculus* L.) із тринуклеотидними праймерами ISSR 3-4 (1—5) та ISSR 3-8 (6—10). Усі смуги є чіткими, що підтверджує оптимальність підібраних умов ампліфікації.

Отже, на підставі проведених експериментальних досліджень можна зробити такі висновки: оптимальним методом екстрагування ДНК гіркокаштанів серед трьох тестованих є метод із використанням ЦТАБ, який відповідає усім вимогам молекулярно-генетичного аналізу; з'ясовано адекватні умови ампліфікації, підібрано праймери, розраховано температури відпалу праймерів, що уможливило подальше використання цього методу для уточнення систематики гіркокаштанів.

1. *Анализ генома. Методы*: Пер. с англ. / Под ред. К. Девиса. — М.: Мир, 1990. — 246 с.
2. *Біологічний словник* / Кол. авт. 2-е вид. — К.: Головна редакція УРЕ, 1980. — 680 с.
3. *Генная инженерия растений. Лабораторное руководство*: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армидиджа, Р. Уодлена. — М.: Мир, 1991. — 408 с.

4. *Доброгаева Д.Н., Котов М.И., Проскудин Ю.И. и др.* Определитель высших растений Украины. — Киев: Наук. думка, 1987. — 548 с.
5. *Саналатий А.В., Солоденько А.Е., Сиволап Ю.М.* Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа // Цитология и генетика. — 2006. — **40**, № 4. — С. 37—43.
6. *Сиволап Ю.М.* Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. Научно-методическое руководство. — Киев: Аграрна наука, 1998. — 156 с.
7. *Тахтаджян А.Л.* Жизнь растений. — М.: Просвещение, 1981. — **5**(2). — 511 с.
8. *Bhat K.V., Lakhanpaul S., Chandel K.P.S.* Molecular markers for characterization and identification of genetic resources of perennial crops // Molecular genetic techniques for plant genetic resources. IPRGI report. — Rome, 1997. — P. 107—117.
9. *Decort I.* The polymerase chaine reaction: a valuable method for retroviral detection // Lymphology. — 1990. — **23**, N 2. — P. 92—97.
10. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. — 1990. — **12**. — P. 13—15.
11. *Hemming E.S.* Try to Chinese chestnut // Horticulture. — 1948. — **26**, N 5. — P. 186—187.
12. *Rychlik W., Spencer W.Y., Roads R.E.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // Nucl. Acids Res. — 1990. — **18**, N 21. — P. 92—97.
13. *Tang S., Knapp S.J.* Simple sequence repeat map of sunflower genome // Theor. Appl. Genet. — 2002. — **105**. — P. 1124—1136.
14. *FAO-WHO.* 2005. Codex Alimentarius Commission. Codex committee of methods of analysis and sampling: consideration of methods for detection and identification of foods derived from biotechnology. General approach and criteria of the methods. 26th Session, Hungary.
15. *EN ISO 21 571.* Foodstuffs — Method of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — nucleic acid extraction. — 2005.

Отримано 28.04.2009

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ ДНК
КАШТАНОВ (РОД *AESCVLUS* L.) ISSR-МЕТОДОМ

Е.Е. Шаванова,¹ Д.А. Киселев,¹ Т.Н. Чеченева^{1, 2}

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Проведен сравнительный анализ разных методов, условий экстракции и амплификации ДНК пяти видов каштана конского (*Aesculus* L.). Подобраны микросателлитные праймеры с ди- и тринуклеотидными мотивами для дальнейшего использования при уточнении их систематического положения.

OPTIMIZATION OF TERMS OF DNA EXTRACTION AND AMPLIFICATION FOR
AESCVLUS L. USING ISSR-METHOD

K.E. Shavanova,¹ D.O. Kyselyov,¹ T.M. Checheneva^{1, 2}

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

15 Heroyiv Oborony, Kyiv, 03041, Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

31/17 Vasykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The authors have compared the different methods and conditions of the DNA extraction and amplification for five species *Aesculus* L. Microsatellite primers for further use in the refinement of their systematic position were selected.

Key words: *Aesculus* L., DNA, extraction, amplification.