

УДК 62.33.29; 34.15

А.Ж. Альжанова*, О.Б. Райзер, А.К. Турганбаева, О.Н. Хапилина, А.А. Какимжанова
РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, Казахстан
*e-mail: lbps@biocenter.kz

Оптимизация методов выделения ДНК из генотипов пшеницы

Выделение ДНК многих видов растений считается трудной задачей из-за высокой концентрации вторичных метаболитов, таких как полисахариды и полифенолы. Существует несколько методик для решения этой проблемы. В своем исследовании мы провели анализ существующих методик по выделению ДНК из растений.

Разрушение клеток обычно проводят механическим путем в водных растворах в присутствии детергентов, растворяющих клеточные мембраны, и хелатирующих агентов, подавляющих нуклеазную активность.

Проведена отработка методов выделения ДНК для молекулярно-генетических исследований. В результате был выбран калий-ацетатный метод, который позволил получить не только высокоочищенные, но и высококонцентрированные препараты ДНК. Частота ДНК варьировала 1,95 до 2,05. Концентрация ДНК варьировала от 361,5 до 3571,8 нг/мкл в зависимости от генотипа пшеницы.

Ключевые слова: ДНК, ПЦР, пшеница, генотип, маркер.

Ә.Ж. Әлжанова, О.Б. Райзер, А.К. Тұрғанбаева, О.Н. Хапилина, А.Ә. Кәкімжанова
Бидай генотиптерінен днк бөліп алу әдістерін оңтайландыру

Полифенол мен полисахарид сияқты екінші метаболиттердің жоғары концентрациясының әсерінен, көптеген өсімдіктерден ДНК-ны бөліп алу қиын мәселе болып отыр. Осы мәселені шешу үшін бірнеше әдістер бар. Өзіміздің зерттеу жұмысымызда өсімдіктерден ДНК-ны бөліп алу әдістеріне талдау жасадық.

Нуклеазалық белсенділікті басатын және жасушалық мембрананы ерітетін, детергенттері бар сулы ерітінділерде механикалық жолмен жасушаны бұзады.

Молекулалық - генетикалық зерттеулер үшін ДНК-ны бөліп алу әдісі оңтайландырылды. Нәтижесінде калий - ацетатты әдіс таңдалды. Ол жағары таза ДНК- ны ғана емес, сонымен қатар жоғары концентрациялы ДНК препаратын береді. ДНК-ның тазалығы 1,95 пен 2,05 аралығында болды. Бидай генотипіне байланысты ДНК концентрациясы 361,5 тен 3571,8 нг/мкл аралығында ауытқыды.

Түйінді сөздер: ДНК, ПТР, бидай, генотип, маркер.

A.Zh. Alzhanova, O.B. Rayzer, A.K. Turganbaeva, O.N. Khapilina, A.A. Kakimzhanova
Optimization of methods of DNA extraction from wheat genotypes

Solation of the DNA of many plant species is considered difficult due to the high concentration of secondary metabolites, such as polysaccharides and polyphenols. There are several methods to solve this problem. In our research, we conducted an analysis of existing methods for DNA extraction from plants.

Disruption of cells is usually carried out by mechanical means in the presence of aqueous solutions of detergents dissolving cellular membranes, and chelating agents that suppress the activity of nuclease.

Methods of DNA extraction for molecular genetic studies. As a result, selected was a potassium- acetate method , which allowed to obtain not only highly pure, but also the highly concentrated preparations of DNA. The frequency of DNA ranged 1.95 to 2.05. DNA concentration ranged from 361.5 to 3571.8 ng/mkl depending on the genotype of wheat.

Keywords: DNA, PCR, wheat, genotype, marker.

Традиционные методы выделения ДНК, которые основываются на использовании этанола для осаждения ДНК, приводят к тому, что полисахариды выпадают в осадок совместно с ДНК. Поэтому исследователи предпочитают использовать фенол-хлороформные методы. Однако в этом случае качество выделяемого ДНК может быть не

последовательным, в связи с неполным удалением ингибиторов ПЦР [1, 2, 3].

В последние годы проводятся работы, позволяющие идентифицировать наличие полиморфизма ДНК как в сортах, так и в растениях-регенерантах [4].

Одним из основных этапов проведения молекулярно-генетических исследований,

является выделение и очистка ДНК из растительной ткани. От метода выделения ДНК зависит успешность дальнейших ПЦР реакций и, как следствие – результат анализа.

Для того, чтобы получить высокоочищенные ДНК, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения. Возможные примеси, которые могут ингибировать проведение анализа с использованием ПЦР. Неполное удаление ингибиторов, полисахаридов и полифенолов приводит к угнетению дальнейших ферментативных реакций в процессе ПЦР и вызывает деградацию ДНК после длительного хранения [5].

В задачи наших исследований входил выбор и оценка наиболее оптимального метода выделения ДНК из растительного материала. Для этого были выбраны широко используемые классические методы и коммерческий набор выделения ДНК.

Материалы и методы

В качестве материала исследований использованы перспективные 10 линий регенерантов яровой мягкой пшеницы: 1) Линия R₁₀ 337/92 с 20% *Fuzarium graminearum* №24-1-1; 2) Линия R₇ 26/97 с 10% *Alternaria alternata* №7-1; 3) Линия R₁₀ Диас 2 с 5% *Bipolaris sorokiniana* № 19; 4) Линия R₆ 26/97 с МС №1-1; 5) Линия R₆ 80/95-3 с 0,3% NaCl № 6-2-1; 6) Линия R₁₀ 475/94-1 с 0,3% NaCl №9-4-2; 7) Линия R₇ 118/94-1 с 0,3% NaCl №1; 8) Линия R₁₀ 285/95-1 с 3% ПЭГ № 22-1; 9) Линия R₁₀ Сибирская 59 с 20% *Fuzarium graminearum*; 10) Линия R₁₀ 118/94-1 с 3% *Alternaria alternata* №6-7-1, созданные методами биотехнологии сотрудниками лаборатории биотехнологии и селекции растений «Национального центра биотехнологии». Выделение геномной ДНК проводили из трех дневных проростков яровой мягкой пшеницы. Для выделения ДНК было использовано 10 генотипов яровой мягкой пшеницы при использовании трех способов выделения ДНК: СТАВ - метод, калий – ацетатный метод, коммерческий набор «Сорб-ГМО-А».

Наиболее распространенным методом выделения геномной ДНК является экстракция с использованием СТАВ – метод основан на использовании в качестве детергента - цетилтриметиламмоний бромид, который хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии СТАВ [6]. При

высоких концентрациях солей (0,7 М NaCl) нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0,4 М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов СТАВ нуклеиновая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе.

Так же выделение ДНК проводили калий-ацетатным методом (Edwards et al., 1991), данный метод основывается на очистке отобранной надосадочной жидкости смесью 1:1 фенол/хлороформа 450 мкл (1-2 раза) [7]. По протоколу, предложенному Edwards К. с сотрудниками (1991) свежую растительную ткань гомогенизировали в пробирке типа Eppendorf объемом 1,5 мл при комнатной температуре в 400 мкл экстракционного буфера (200 мМ трис - HCl, pH=7,5; 250 мМ NaCl; 25 мМ EDTA; 0,5% SDS).

В качестве дополнительного метода использовали коммерческий набор реагентов «Сорб-ГМО-А» (Синтол). Метод экстракции с использованием набора «Сорб-ГМО-А» (Синтол) основан на экстракции и очистке ДНК с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромид и протеиназы К. Оценку эффективности выделения ДНК из растительного материала проводили с использованием спектрофотометра *Nano-Drop*.

Результаты и их обсуждение

В результате исследований три способа выделения ДНК: СТАВ - метод, калий – ацетатный метод, коммерческий набор «Сорб-ГМО-А» давали высокочистые препараты тотальной ДНК десяти генотипов пшеницы. При этом, однако, только калий-ацетатный метод позволил получить не только высокоочищенные, но и высококонцентрированные препараты ДНК. Кроме того, данный метод был достаточно прост в исполнении и не требовал больших временных затрат.

Установили, что количество ДНК во всех вариантах опыта соответствует требованиям для постановки полимеразной цепной реакции.

Концентрация ДНК при использовании СТАВ-метода варьировала от 62 до 564,8 нг/мк. В среднем, концентрация ДНК на 1 образец составила 208,2 нг/мкл, соотношение A260/A280 колебалось от 2,04 до 2,17. При использовании коммерческого набора «Сорб-ГМО-А» средняя чистота ДНК (A260/A280)

составила от 1,53 до 1,94. Концентрация варьировала от 103,3 до 413,01 нг/мкл. Среднее количество ДНК на один образец составило 173,3 нг/мкл.

Наиболее качественные препараты ДНК были получены с использованием методики

Edwards, частота ДНК варьировала от 1,95 до 2,05. Концентрация ДНК колебалась от 361,5 до 3571,8 нг/мкл в зависимости от генотипа пшеницы.

Таблица – Концентрация и чистота препаратов ДНК, полученных с использованием СТАВ-метода, калий-ацетатного метода и коммерческого набора «Сорб-ГМО-А»

Растение	Показания биофотометра <i>Nano-Drop</i>					
	СТАВ-метод (Doyle and Doyle, 1990)		Калий-ацетатный метод (Edwards et al., 1991)		Коммерческий набор «Сорб-ГМО-А»	
	Концентрация ДНК (нг/мкл)	OD 260/280	Концентрация ДНК (нг/мкл)	OD 260/280	Концентрация ДНК (нг/мкл)	OD 260/280
<i>T. aestivum</i>						
337/92 с 20 % F.g. №24-1-1	209,6	2,16	361,5	2,00	413,01	1,88
26/97 с 10% А.а. № 7-1	49,8	2,04	1047,1	1,98	125,04	1,71
Диас 2 с 5% В.с. №19	185,9	2,17	1490,3	1,95	129,89	1,68
26/97 с МС №1-1	110,0	2,16	971,1	1,96	115,15	1,68
80/95-3 0,3% NaCl №6-2-1	564,8	2,1	1142,9	2,00	179,15	1,94
475/94-1 с 0, 3% NaCl №9-4-2	214,3	2,1	725,9	1,97	179,10	1,70
118/94-1 с 0,3% NaCl №1	62,0	2,12	2451,9	2,05	103,30	1,53
285/95-1 с 3%ПЭГ №22-1	389,8	2,05	3571,8	2,05	196,05	1,76
Сибирская 59 с 20 % F.g.	119,0	2,09	1582,7	2,01	247,30	1,76
118/94-1 с 3% А.а. № 6-7-1	176,7	2,15	2403,9	2,03	181,51	1,71

Из растений регенерантов пшеницы была экстрагирована ДНК необходимого качества и в необходимом количестве при использовании трех протоколов. Сформирована коллекция ДНК препаратов для последующего молекулярного анализа.

Визуализацию экстрагированной ДНК проводили в УФ-свете, для чего проводили электрофорез в 1%-ном агарозном геле. На пленке раскапывали по 4 мкл бромфенолового

синего, в капли вносили по 7 мкл ДНК, перемешивали пипетированием. Гель помещали в камеру с ТБЕ-буфером. Электрофорез проводили при 299 mA и 90 V в течение 30 минут (рисунок). Сравнительный анализ выбранных методов экстракции растительной ДНК показал, что для проведения ПЦР наиболее оптимальным методом является калий-ацетатный метод Edwards.

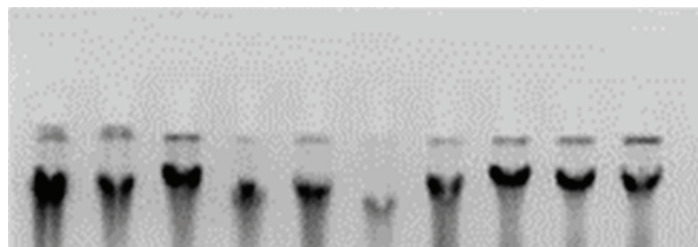


Рисунок – ДНК пшеницы экстрагированной методом К. Edwards

Литература

- 1 Сомма М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 4. Выделение и очистка ДНК // Всемирная организация здравоохранения. Европейское бюро. - 20 с.
- 2 Дрейпер Дж, Скотт Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений // Лабораторное руководство. - М.: Мир, 1991. - 124 с.
- 3 Cheng Y.J., Guo W.W., Yi H.L. An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species // Plant Mol Biol Rep. - 2003. - Vol. 21. - P. 177.
- 4 Малышев С.В. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК маркеров // Методические рекомендации. - Минск, 2006. - 28 с.
- 5 Ivanova N.V., Fazekas A.J., Hebert P.D.N. Semi-automated Membrane-Based Protocol for DNA isolation from Plants // Plant Mol Biol Rep. - 2008. - Vol. 26. - P. 186-198.
- 6 Doyle J. J., Hewitt G., Johnson W.B. DNA protocols for plants // Molecular Techniques in Taxonomy. - 1991. - Vol. 57. - P. 283-293.
- 7 Edwards K., Johnstone C., Thomson C.A. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // NucleicAcids Res. - 1991. - Vol. 19. – P. 1349.