

УДК 630* 165.6

Доц. Р.Т. Гут, канд. біол. наук;
інж. Ю.В. Вербовицька – НЛТУ України**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РІЗНИХ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК
З ХВОЇ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ (PINUS SYLVESTRIS L.)**

Наведено результати порівняння різних методів виділення ДНК на основі спектрофотометричного, рестрикційного аналізу та методу ПЛР із застосуванням ISSR – праймерів, що використовуються під час вивчення генетичного поліморфізму у рослин.

Ключові слова: гетерозиготність, поліморфізм, ПЛР, праймери, молекулярні маркери, секвенування, клонування.

*Doc. R.T. Gout; eng. Y.V. Verbovytska – NUFWT of Ukraine***The comparative analyses of DNA extraction methods from needles
of Scots Pine (Pinus Sylvestris L.)**

The results of DNA extraction analyses from needles of Scots pine by different methods are presented. These methods were used from nucleotide polymorphism.

Keywords: heterozygosity, polymorphism, PCR, primers, molecular markers, sequencing, cloning.

Висока генетична поліморфність деревних рослин, велика варіабельність впливів середовища на генотип зумовлюють значну внутрішньовидову мінливість, тому основною метою лісівників на даному етапі має бути не тільки створення мінімальних умов для виживання деревних порід, але й збереження популяцій з генетичним різноманіттям, яке б забезпечило їх виживання у стресових умовах навколишнього середовища.

Поряд з традиційним селекційним напрямком відбору дерев за фенотипом, для вирішення генетико-селекційних проблем широкого використання набувають молекулярно-генетичні методи. Велике значення має вивчення гетерозиготності та аналіз поліморфізму ДНК, що дає змогу виявити між- та внутрішньовидову мінливість. Високий рівень поліморфізму виявлений під час вивчення невідомих локусів. Для цього використовуються ISSR-праймери з випадковою нуклеотидною послідовністю, які сконструйовані на основі простих внутрішніх повторів нуклеотидних послідовностей геному [4, 5]. За інформацією про їх мінливість геному можна визначити генетичні віддалі між досліджуваними видами, формами та встановити філогенетичний зв'язок. Отже, молекулярно-генетичні методи дають змогу швидше і надійніше ідентифікувати генотипи та дають змогу ефективніше проводити генетичну оцінку популяцій.

Високомолекулярна ДНК необхідна для отримання геномних бібліотек, ідентифікації та виділення генів у процесі генно-інженерних маніпуляцій, а також для вивчення організації та експресії генів [3]. Методи виділення ДНК та її аналізу служать невід'ємною частиною багатьох молекулярно-генетичних досліджень деревних рослин.

Метою нашої роботи було провести порівняльний аналіз різних методів виділення ДНК з хвої сосни і відібрати серед них такий, який би забезпечив отримання добре очищених препаратів ДНК з достатньо довгими молекулами і з невеликими затратами часу та коштів.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження слугувала сосна звичайна (*Pinus sylvestris* L.). Матеріалом для виділення сумарної ДНК була свіжа хвоя сосни. Сумарну ДНК виділяли з використанням таких комерційних наборів фірми DNeasy plant mini kit "Qiagen" та Nucleon PhytoPure plant DNA extraction kit "Nucleon Bioscience", а також модифікованим методом Делапорта [3], СТАВ-методом Дж. Дойла [1, 2].

Модифікований метод Делапорта

100 млг хвої подрібнювали в рідкому азоті, додаючи для зв'язування поліфенолів 5-6 %-й Polyclar AT ("Serva" Німеччина), а також буфер, який містив 0,1 М трис-НCl з pH 8,2; 0,05 М EDTA ("Sigma" США); 0,15 М NaCl; 0,1 М аскорбінову кислоту, 5 %-у парааміносаліцилову кислоту ("Sigma"), 1 % β -меркаптоетанол ("Ferak" Німеччина); 1 %-й діетилдитіокарбомат та 2-3 % SDS ("Sigma").

Одержану гомогенну суспензію після 15-хвилинної інкубації на водяній бані при 65 °C центрифугували протягом 20 хв. при 4000 об./хв. Надосадову рідину депротейнізували сумішшю фенол-хлороформ (1:1) протягом 10 хв. і центрифугували за тих самих умов. Нуклеїнові кислоти осаджували 0,7-1 об'ємами ізопропанолу (попередньо охолодженого до -20 °C) протягом 30 хв. при -20 °C. Осад нуклеїнових кислот тричі промивали 70 %-им етанолом та розчиняли у ТЕ-буфері, що містить 10 мМ трис-НCl (pH 7,4) та 1 мМ EDTA. У розчин вносили 100мкг/мл РНКазу А ("Qiagen") та 0,5 М NaCl. Інкубацію проводили при 37 °C впродовж однієї години в термостаті. Депротейнізацію здійснювали сумішшю фенол-хлороформ (1:1), до якої вносили SDS та ацетат калію ("Sigma") до кінцевої концентрації 1,1 % та 1,2 М відповідно. Суміш інкубували у льодовій бані впродовж 30 хв. при 0 °C, а потім центрифугували 5 хв. при 10000 об./хв. ДНК осаджували ізопропанолом, промивали тричі 70 %-им етанолом та розчиняли у ТЕ-буфері.

СТАВ-метод Дж. Дойла

Розтертий рослинний матеріал додавали до буфера, що містить 0,1 М трис-НCl з pH 8,0; 0,02 М EDTA ("Sigma"); 1,5 М NaCl; 0,005 М аскорбінову кислоту ("Sigma"), 1 %-й меркаптоетанол ("Ferak"); 0,004 М діетилдитіокарбомат ("Sigma"), PVP 40 ("Loba" Австрія) та бромід цетилтриметиламоній (СТАВ) по 2 % та протеїназу К 1 млг/мл ("Sigma"). Гомогенну суміш інкубували на водяній бані при 65 °C, центрифугували протягом 30 хв. при 4000 об./хв. Білки двічі осаджували сумішшю хлороформ-ізоамілового спирту (24:1) протягом 10 хв. Центрифугували суміш при 13000 об./хв. впродовж 20 хв. Нуклеїнові кислоти осаджували 0,7-1 об'ємами ізопропанолу (попередньо охолодженого до -20 °C) протягом 30 хв. при -20 °C. Осад нуклеїнових кислот тричі промивали 70 %-им етанолом та розчиняли у ТЕ-буфері, що містить 10 мМ трис-НCl (pH 7,4) та 1 мМ EDTA. Для очищення ДНК від РНК у розчин вносили 100мкг/мл РНКазу А ("Qiagen"). Депротейнізацію здійснювали сумішшю фенол-хлороформ (1:1).

Спектрофотометричний аналіз зразків ДНК

Якість препаратів ДНК визначали за показниками оптичної густини (А) та концентрацією на спектрофотометрі Biotech Photometer UV1101/1101T "Biochrom". Відношення A_{260}/A_{280} становило 1,7-2,0. Середня молекулярна маса дорівнювала приблизно 20000-25000 пар нуклеотидів.

Препарати ДНК гідролізували рестриктазами другого класу EcoRI і BamHI ("Fermentas" Литва). На 1 мкг ДНК припадало 4-10 МО активності рестриктаз. Інкубацію проводили у відповідних буферах ("Fermentas") протягом 2 годин при 37 °С. Реакцію рестрикції зупиняли заморожуванням.

Електрофорез тотальної ДНК здійснювали у 0,8 %-ному агарозному гелі, а ПЛР продуктів фракціонували у 1,7 %-ному агарозному гелі та використовували 1× ТАЕ-буфер. Агарозні гелі профарбовували бромистим етидієм ("Sigma") та фотографували цифровою камерою Samsung 340.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для ампліфікації застосовувалися такі реактиви фірми "Fermentas" (Литва): dNTP mix 2 mM, $MgCl_2$ 25 mM, 10 x PCR buffer, Taq-DNA polymerase, праймери CR-214, CR-213 "Sigma".

Ампліфікацію сумарної ДНК з даними праймерами проводили за таких умов: dNTP mix 0,2 mM, $MgCl_2$ 2,0 mM, 1 x PCR buffer, Taq-DNA polymerase 0,13 од., праймера 1 мкМ, ДНК 20 нг у кінцевому об'ємі 20 мкл. Програма для ампліфікації: первинна денатурація – 5 хв. при 95 °С; 30 циклів у режимі: денатурація 94 °С – 1 хв., віджиг – від 34 до 51 °С – 1хв., елонгація – 72 °С 1 хв.; останній цикл елонгації – 72 °С 10 хв. Усі результати ампліфікації перевіряли тричі.

Результати та обговорення

Основоположними методами в чисельних молекулярно-генетичних підходах, що використовуються під час вивчення рослинних організмів і які визначають успіх досліджень, є методи виділення ДНК. Розроблено ряд методів, щоб забезпечити якість, легкість та ефективність виділення і чистоту виділеної сумарної ДНК.

Виділення ДНК з рослинного матеріалу є складнішим процесом, ніж з тканин тварин, оскільки рослинні екстракти містять більшу кількість полісахаридів та пігментів, від яких досить складно очистити ДНК. Деякі полісахариди пригнічують активність ферментів, що модифікують ДНК, зокрема ферментів рестрикції. Істотним негативним фактором під час виділення ДНК є руйнування клітинних стінок. Багато методів, які використовують для одержання ДНК, призводять до її фрагментації.

Основним завданням даного порівняльного аналізу методів було знайти найефективніший і водночас недорогий метод виділення ДНК. У таблиці представлено порівняльну характеристику використаних нами методів. Комерційні набори забезпечують високий вихід ДНК, але у зв'язку з дороговизною їх доступність є обмеженою. СТАВ-метод передбачає використання дорогих реагентів, зокрема протеїназа К, тому ми зупинились на модифікованій методі Делапорта, оскільки, цей метод не потребує використання проте-

їнази К, внесли певні модифікації. Оскільки і у СТАВ-методі і в методі Деллапорта усунення РНК РНКазою А відбувається після стадії осадження нуклеїнових кислот, витрати часу на екстракцію ДНК досягають до 2-2,5 годин. Тому в буфер для лізису ми вносили РНКазу А у концентрації 100 млг/мл, яка досить ефективно усуває РНК і при 65 °С, що зменшує затрати часу на екстракцію ДНК. Депротейнізацію здійснювали, додаючи ацетат калію, який ефективно осаджує комплекси SDS з білками та полісахаридами і тим самим виключає застосування фенолу. Оскільки фенол є дуже токсичним реагентом, застосування його є не бажаним. Наступні стадії екстракції ДНК залишилися без змін.

Табл. Порівняльна характеристика різних методів виділення ДНК

Параметри	Комерційні набори		СТАВ-метод	Метод Деллапорта, модифік. Тищенко	Метод Деллапорта, модифік. нами
	DNeasy plant mini kit "Qiagen"	Nucleon PhytoPure plant DNA extraction kit "Nucleon Bioscience"			
Зручність методу	висока	середня	середня	середня	середня
Можливість використання для великої к-сті видів	так	Залежить від виду рослин	Залежить від виду рослин	Залежить від виду рослин	Залежить від виду рослин
Час отримання зразків ДНК	Близько 1 години	1-2 години	2-3 години	2-3 години	1-2 години
Зберігання зразків ДНК	Довготермінове	Довготермінове	Довготермінове	Довготермінове	Довготермінове
Якість препаратів ДНК	висока	висока	середня	середня	середня
Застосування фенолу	ні	ні	ні	так	ні
Використання зразків ДНК у подальшій роботі	ПЛР, RAPD, AFLP, RFLP аналізи, блотинг, мікросателітний аналіз, секвенування	ПЛР, RAPD, AFLP, RFLP аналізи, секвенування	ПЛР, RAPD, AFLP, RFLP аналізи, секвенування	ПЛР, RAPD, AFLP, RFLP аналізи, секвенування	ПЛР, RAPD, AFLP, RFLP аналізи, секвенування

На рис. 1 представлений електрофорез сумарної ДНК, виділеної різними методами, як видно, вихід ДНК є досить високим у всіх випадках.

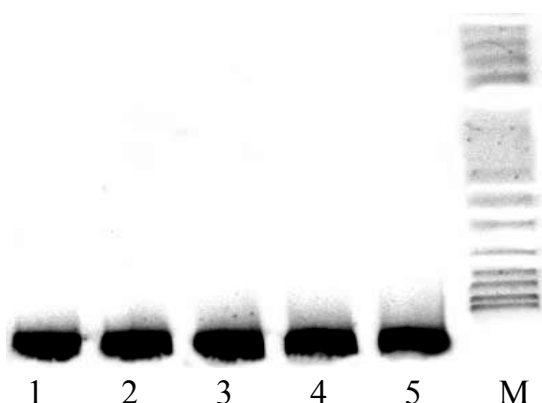


Рис. 1. Електрофорез сумарної ДНК виділеної різними методами:

1 – сумарна ДНК, виділена DNeasy Plant Mini Kit; 2 – сумарна ДНК, виділена Nucleon Phyto Pure plant mini kit; 3 – сумарна ДНК, виділена СТАВ-методом; 4 – сумарна ДНК, виділена методом Деллапорта, модифікованим Тищенко; 5 – сумарна ДНК, виділена методом Деллапорта, модифікованим нами; М – Gene Ladder mix

На основі спектрофотометричного аналізу показано, що концентрація ДНК виділена із 100 мг хвої сосни при A_{260} , становить від 250 мкг/мл до 500 мкг/мл (рис. 2). Як видно з даних, представлених на рис. 2, комерційні набори забезпечують вихід ДНК у межах від 340 мкг/мл до 500 мкг/мл, а методи Делапорта та СТАВ-метод у межах від 280 до 420 мкг/мл. Однак, чистота препаратів ДНК виділеної усіма зазначеними методами є досить високою 1,8-2,0 (рис. 3) і знаходиться на однаковому рівні. Проте максимальні величини виходу і чистоти ДНК досягаються комерційними наборами.

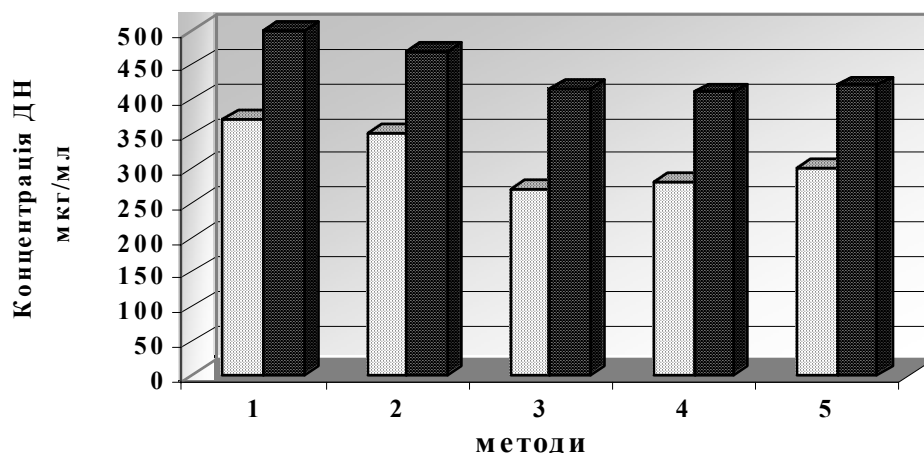


Рис. 2. Концентрація ДНК, виділена різними методами (див. рис. 1)

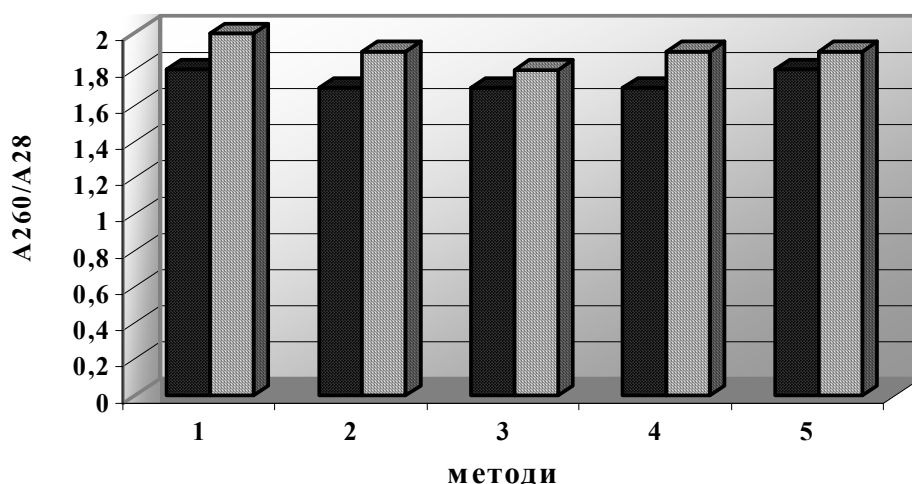


Рис. 3. Чистота ДНК (A_{260}/A_{280}), виділена різними методами (див. рис. 1)

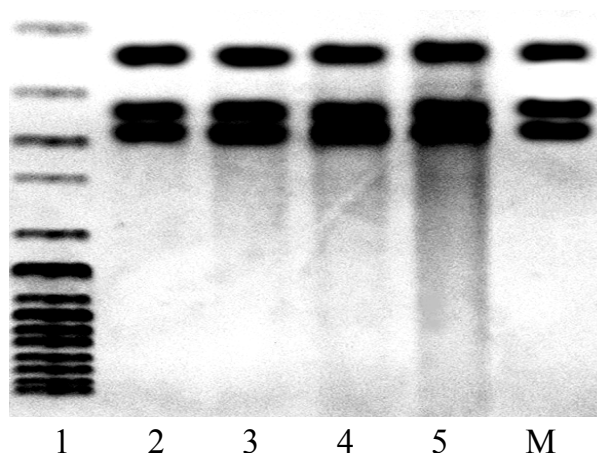


Рис. 4. Продукти ампліфікації сумарної ДНК з праймером CR-213:

1 – продукти ПЛР сумарної ДНК, виділеної DNeasy plant mini kit; 2 – продукти ПЛР сумарної ДНК, виділеної Nucleon PhytoPure plant DNA extraction kit; 3 – продукти ПЛР сумарної ДНК, виділеної СТАВ методом; 4 – продукти ПЛР сумарної ДНК, виділеної методом Делапорта, модифікованим Тищенко; 5 – ПЛР продукти сумарної ДНК, виділеної методом Делапорта, модифікованим нами; М – Gene Ladder mix

Щоб вивчити можливості використання сумарної ДНК, виділеної різними методами, ми провели аналіз сумарної ДНК ендонуклеазами рестрикції другого класу. Як показав аналіз, усі зразки ДНК, виділеної різними методами, розщеплюються однаково добре.

Для аналізу даних зразків сумарної ДНК, виділеної вказаними вище методами, був використаний метод ПЛР з ISSR-праймерами, що використовуються під час вивчення генетичного поліморфізму у рослин. Результати ампліфікації представлені на рис. 4. Як видно з рисунка, продукти ампліфікації є однотипними, їх можна чітко ідентифікувати.

Висновки. Комерційні набори забезпечують високий вихід ДНК, але у зв'язку з дороговизною їх доступність є обмеженою. А модифікований нами метод Делапорта забезпечує швидке, легке та якісне виділення ДНК з мінімальними затратами коштів. Таким чином, на основі спектрофотометричного, рестрикційного та ПЛР-аналізу з ISSR-праймерами встановлено, що метод Делапорта, модифікований нами, можна успішно застосовувати в роботах з вивчення генетичного поліморфізму у хвойних порід.

Література

1. Doyle J.J. Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue// *Phytochem. Bull.* – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.
2. Doyle J.J. Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue// *Focus.* – 1990, № 12. – P. 13-15.
3. Дрейпер Дж. Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений// Генная инженерия растений: Лаб. руководство: пер. с англ./ Под ред. Дрейпера. – М.: Мир. – 1991. – С. 248-252.
4. Fang D.Q. Rose M.L. Identification of closely related citrus cultivar with inter-simple sequences repeat markers// *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – Vol. 95. – P. 408-417.
5. Arcade A. Anselin F. Faivre Rampant P. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch// *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – Vol. 100. – P. 299-307.

УДК630*5

Ст. викл. В.М. Куриляк – НЛТУ України

ФОРМУВАННЯ СКЛАДУ У РІЗНИХ ТИПАХ БУКОВИХ ЛІСІВ НА ПРИКАРПАТТІ

Охарактеризовано особливості формування складу насаджень в межах вікових періодів за останні 50 років. Наведено середні формули складу у різних групах типів лісу і проаналізовано причини, що впливають на зміну складу бучин на Прикарпатті.

Ключові слова: бук, зміна складу, типи лісу.

V.M. Kurylyak – NUFWT of Ukraine

Shaping a composition in different types of beech woods in Prykarpattya region

In the article given feature particularities of shaping a composition beech woods within ancient periods for last 50 years. Brought average formulas of composition in different groups of types a wood and analysed reasons, which influence upon changing a composition of beech stands in Prykarpattya region.

Keywords: beech, changing a composition, types a wood.