

УДК 581.174

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ ДНК ВИЩИХ РОСЛИН

Н. Топчій

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, м. Київ 01033 Україна
e-mail: topchiy_nataliya@univ.kiev.ua*

Обговорено методи виділення ДНК з вегетативних клітин вищих рослин та їхнє використання для різноманітних експериментальних досліджень у різних галузях біології.

Ключові слова: ДНК, вищі рослини, методи, листки, тканини.

Останніми десятиріччями простежується значний прогрес у вивченні нуклеїнових кислот живих організмів, зокрема вищих рослин. Одержання препаратів ДНК – першочергове завдання для дослідження структури і функцій ДНК. Для цього потрібно одержати максимально очищені від домішок і мінімально деградовані препарати ДНК з урахуванням особливостей рослинних тканин, їхнього хімічного складу (вмісту вуглеводів, ліпідів, пігментів та інших сполук) й анатомічної будови (товщини клітинних оболонок тощо).

Існує широкий вибір методів виділення й очищення рослинної ДНК, які продовжують модифікувати й удосконалювати. Використання того чи іншого методу виділення ДНК залежить від специфіки досліджуваного матеріалу і мети: одержати сумарну, ядерну, пластомну ДНК [1, 16–18, 20]. Однак будь-який обраний метод повинен бути порівняно простим, добре відтворюваним і давати змогу швидко одержувати достатню кількість очищених препаратів ДНК. Зазначимо, що з огляду на різноманітність живих об'єктів універсальних методів виділення ДНК нема.

Виділення рослинної ДНК пов'язане з низкою методичних труднощів: великою кількістю домішок (полісахаридів, пігментів, дубильних речовин) [1, 3], які ускладнюють очищення ДНК тощо.

Вихід ДНК залежить від природи початкового матеріалу та зумовлений вмістом ДНК у заданій тканині, а також наявністю і характером домішок, які перешкоджають очищенню ДНК. Для рослинних об'єктів вихід ДНК, як звичайно, нижчий, ніж для тканини тварин [1, 3, 19]. Якість одержаного препарату ДНК визначена завданнями подальшої роботи. У будь-якому випадку ДНК повинна містити мінімальну кількість домішок полісахаридів, білків і РНК (не більше 2–3%), що позначається на так званих спектральних характеристиках препаратів (A_{260}/A_{230} = не більше 2–3 (для полісахаридів); A_{260}/A_{280} = не більше 2 (для білків)) [6].

Для вивчення характеру деградації і стану метилування ДНК протягом старіння листків цукрового буряка ми використали методи виділення й очищення, які дали змогу одержувати якісні препарати ДНК з мінімальною кількістю домішок полісахаридів і білків (не більше 2–3%), про що свідчили спектральні характеристики препаратів [10–12].

Найчастіше за все препарати ДНК виділяють з паростків і листків вищих рослин [2, 9–13, 15, 19].

З метою пошуку оптимального методу виділення високомолекулярної «чистої» ДНК ми використовували різні методи. Зокрема, для виділення сумарної ДНК листків цукрового буряка застосовували метод з використанням ЦТАБ-буфера, який ґрунтується

на властивості нуклеїнових кислот формувати стійкі розчинні комплекси з детергентом цетилтриетиламоніумбромідом (ЦТАБ) за високої концентрації солі [1, 17]. Цим методом виділяють препарати ДНК з рослин рису, помідорів, кукурудзи, перцю тощо. Однак такий метод виявився не зовсім вдалий для виділення високомолекулярної ДНК цукрового буряка, оскільки вихід чистих її препаратів був досить низький, вона містила значну кількість вуглеводних домішок, до того ж, одержані препарати ДНК мали домішки РНК.

Під час досліджень ми використовували препарати сумарної ДНК, виділені модифікованим методом Деллапорта [10–12], що був оптимальним для наших досліджень. Модифікація методу полягала у змінах умов виділення препаратів ДНК: введення в екстракційний буфер Polyclar AT, аскорбінової та парааміносаліцилової кислот, діетилдитіокарбамату, зміні концентрацій NaCl та EDTA (порівняно зі стандартним методом) та подальших методів очищення ДНК. Цей метод виявився ефективним для досліджень молекулярно-генетичних механізмів старіння вищих рослин екстрактів ДНК, крім цукрового буряка, з кукурудзи, винограду, пшениці та інших культур.

Для одержання високополімерного препарату ДНК потрібно, по-перше, інгібувати нуклеази, які вивільняються протягом руйнування клітин. З метою зниження їхньої активності процес виділення проводять у неоптимальному для них лужному середовищі. Протягом гомогенізації тканин до середовища додають інгібітори: EDTA, який зв'язує іони Mg^{2+} [1], необхідні для дії ДНК-аз, парааміносаліцилової кислоти, діетилдитіокарбамат, які по-різному пригнічують ДНК-ази [1, 3]. Додецилсульфат натрію часто додають з метою лізису клітинних мембран, збільшення виходу і поліпшення депротейнізації ДНК, оскільки в разі зв'язування Ds-Na з білками утворюються розчинні комплекси [15]. Також він інтенсивно порушує водневі та гідрофобні зв'язки в молекулах білків, розчиняє багато раніше нерозчинних білків [4]. Комплекси білка з Ds-Na набувають значного негативного заряду завдяки сульфогрупам іона додечилсульфату [1, 4]. До того ж, Ds-Na поряд з хелатами запобігає забрудненню ДНК двовалентними іонами металів і руйнуванню її дезоксирибонуклеазою; NaCl, який є в складі багатьох буферів для виділення ДНК, екстрагує нуклеопротейдний комплекс [13].

Крім Ds-Na, для лізису тканин інколи використовують такі речовини, як 1% цетавлон (цетилтриметиламонійбромід) [1, 4], 4% саркозил (додечилсаркозинат натрію) [4] тощо, які мають переваги і недоліки. Наприклад, Ds-Na випадає в осад на холоді або за наявності іонів калію, а саркозил розчиняється на холоді, проте утворює нерозчинні солі з іонами магнію і мангану.

Інколи до лізувальних буферів уводять протеолітичні ферменти бактеріального походження, які не втрачають активності в разі підвищених температур. Особливо популярна протеїназа K, що має широкий спектр субстратної специфічності.

Характерною особливістю вищих рослин є те, що їхні тканини містять велику кількість поліфенольних сполук, до яких належать водорозчинні пігменти та дубильні сполуки [1]. Лізис клітин супроводжується окисненням поліфенолів у разі активації клітинних поліфенолоксидаз, унаслідок чого виникають продукти, які поряд з наявними водорозчинними рослинними пігментами здатні незворотно зв'язуватися з ДНК, що перешкоджає її подальшому очищенню [4, 14]. Забарвлені домішки в препаратах ДНК не будуть відображати справжніх властивостей ДНК. З метою попередження окиснення поліфенольних сполук у лізувальну суміш додають антиокисники – β -меркаптоетанол, діетилдитіокарбамат, який інгібує поліфенолоксидази та збільшують концентрацію аскорбінової кислоти (до 100 мМ). Без використання перерахованих сполук на початкових етапах ви-

ділення всі спроби очистити ДНК від пігментів на наступних стадіях можуть виявитися марними [1, 6].

Після лізису часто проводять депротейнізацію одержаного лізату хлороформом. Дуже часто в різних методах рекомендують використовувати суміш хлороформ : фенол (1:1) [1, 4 9, 13] для очищення ДНК. Однак це має низку важливих недоліків, зокрема, руйнування високополімерних молекул ДНК на фрагменти під час механічного збовтування. Крім того, фенол вибірково екстрагує сателітну ДНК АТ-типу, спричинює збільшення втрати ДНК, на 10% знижує густину ДНК. Унаслідок кількаразової обробки ДНК сумішшю фенол : хлороформ втрачається четверта частина ДНК, у разі обробки лише хлороформом – 16%. Хлороформ, до того ж, може вибірково екстрагувати одноланцюгову ДНК (близько 54% протягом трьох обробок) [6].

Під час депротейнізації лізувального розчину з хлороформом білок утворює гель на поверхні поділу хлороформ–вода, тоді як натрієва сіль ДНК залишається у водній фазі [1, 3].

Для виділення ДНК з препарату нуклеїнових кислот, який поряд з ДНК містить РНК, застосовують ферментативну деградацію РНК РНК-азою. Внесений фермент у розчин ДНК видаляють депротейнізацією хлороформом, ДНК осаджують ізопропанолом.

Спектральні характеристики препаратів ДНК, виділених наведеним модифікованим нами методом Деллапорта ($A_{260}/A_{230} = 2,0-2,3$; $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$), не перевищували загальноприйнятих меж [10–12].

З метою вивчення конфірмаційного стану ДНК використовують сечовино-фосфатний метод, який дає змогу відокремити дволанцюгову ДНК від одноланцюгової ДНК та РНК. Цей метод пов'язаний з принципом іонообмінної хроматографії, який полягає у тому, що заряджені молекули зворотно адсорбуються іонообмінником, так що молекули можуть зв'язуватись і елюювати залежно від іонного складу середовища [7]. Метод хроматографії на колонках надає найбільші можливості для препаративного розділення та ідентифікації ДНК у нативному, денатурованому і частково ренатурованому стані [4, 7].

Розділення на іонообмінниках звичайно відбувається у дві стадії: спершу сполука, яку необхідно відділити, зв'язується з іонообмінником в умовах утворення стабільного зв'язку, потім колонку елюють буфером з іншим значенням рН або з іншою іонною силою, внаслідок чого компоненти буфера конкурують зі зв'язаною речовиною за зв'язувальний центр [7].

Сечовино-фосфатний метод відрізняється від інших методів виділення порівняно простою і швидкістю. Одержані препарати мають високу чистоту за стандартними критеріями. Вихід ДНК також значний; для рослин використання цього методу інколи дає змогу збільшити кількість одержаної ДНК в десять разів [4, 6, 7]. Цей метод дає змогу зменшити ступінь механічних пошкоджень ДНК протягом виділення цієї молекули. Недолік методу, полягає у тому, що високомолекулярна ДНК може необоротно зв'язуватись з оксіпатитом [4, 7].

Оксіпатит – це кристалічна формула $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, яку одержують з кристалів $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ [7]. Колонки з оксіпатитом можуть зв'язувати речовини, які взаємодіють з кальцієм, у тому числі ДНК, РНК, нуклеогістон, полі- й олігонуклеотиди і фосфопротейни [4, 6, 7]. Зв'язування відбувається через фосфатні групи зв'язувальної речовини за низької концентрації фосфатного буфера, елюювання – шляхом збільшення його концентрації [7].

Зазначений метод має суттєву перевагу у випадку хроматографії нуклеїнових кислот, яка полягає у невеликій залежності поведінки речовини на колонці від молекулярної

маси [4, 7]. Цим методом виділяють препарати ДНК цукрового, кормового і столового буряків, сої, винограду та інших культур. У таблиці наведено показники ефективності використання методів виділення сумарної ДНК з різних рослинних об'єктів, що ґрунтуються на спектральних характеристиках якості одержаних препаратів.

Як відомо, у складі сумарної ДНК рослин є ядерна, хлоропластна і мітохондріальна ДНК. Більша частина генетичної інформації клітин міститься в яДНК, значно менша – в ДНК клітинних органел (хлоропластах і мітохондріях) [5]. Ядра клітин вищих рослин, як звичайно, містять значно більше ДНК, ніж, наприклад, ядра клітин ссавців [5, 6, 8]. Однак є дані, що в листках деяких вищих рослин, великих за розміром, значну частину сумарної ДНК може становити хлоропластна (її майже вдвічі більше, ніж ядерної) завдяки значній кількості хлоропластів, у яких містяться сотні копій хпДНК. У середніх листках кількість хпДНК може бути такою самою, як і ядерної, а в малих – третину всієї ДНК [8].

Ядерна ДНК – це винятково гетерогенна суміш макромолекул, а молекули хпДНК рослинних клітин усі мають практично одну й ту саму будову, до того ж, вони однакові у всіх клітин тканин рослин [5]. Кількість хпДНК залежить від кількості хлоропластів, яка в свою чергу залежить головно від умов освітлення.

З метою попередження деградації ДНК, спричиненої активацією нуклеаз і серинових протеаз, у лізувальний буфер для виділення ядер та яДНК часто додають, крім ЕДТА, такі інгібітори, як ЕГТА і PMSF з кінцевою концентрацією 0,1 мМ [1, 3]. Крім того, виділення виконують на льоді, за низьких температур навколишнього середовища. Триетаноламін і β-меркаптоетанол, які є в складі буфера, також інгібують нуклеази [3]. Цукроза є важливим компонентом середовища для розтирання під час виділення ядер, оскільки потрібна для утворення ізотонічності [1, 3].

Для очищення ядер від цитоплазматичних домішок, передусім хлоропластів, у буферний розчин додають неіонний детергент нонідет Р-40, який розчиняє хлоропласти і дає змогу позбутись забарвлення. Очищення проводять доти, доки препарати ядер не набудуть молочного кольору. Методи виділення яДНК майже всі ґрунтуються на подібних методологічних принципах, проте відрізняються інколи компонентами лізувального

Ефективність використання методів виділення сумарної ДНК з різних рослинних об'єктів за спектральними показниками

Метод	Спектральні характеристики препаратів ДНК	
	A260/A230	A260/A280
Цукровий буряк		
Метод Деллапорта	2,0–2,2	1,6–1,8
Метод з використанням ЦТАБ-буфера	4,5–4,7	2,5–2,7
Сечовино-фосфатний метод	2,0–2,1	1,6–1,8
Кукурудза		
Метод Деллапорта	1,9–2,1	1,4–1,6
Метод з використанням ЦТАБ-буфера	2,0–2,3	1,7–1,9
Сечовино-фосфатний метод	2,0–2,1	1,5–1,7
Помідори		
Метод Деллапорта	1,8–2,0	1,6–1,7
Метод з використанням ЦТАБ-буфера	2,1–2,3	1,8–1,9
Сечовино-фосфатний метод	-	-

буфера, їхніми концентраціями. Наприклад, додавання ЕГТА і PMSF з кінцевою концентрацією 0,1 мМ до лізувального буфера для виділення яДНК з ядер клітин дало змогу поліпшити якість препаратів ДНК.

Методи, які використовують для виділення ДНК з органел, дуже схожі на методи виділення ядерної ДНК. Як звичайно, використовують такі процедури: осадження важчих ядер після руйнування клітин, центрифугування на середніх швидкостях хлоропластів і наступне високошвидкісне центрифугування того самого екстракту для одержання осаду мітохондрій. Після промивання та обробки ДНК-азою з осадів органел виділяють ДНК.

Осаджують ДНК з розчину ізопропанолом чи етанолом, залишаючи на холоді.

З'ясовано, що для більшості рослинних клітин кількість хпДНК може становити 1–10% від сумарної ДНК (в одному хлоропласті може бути декілька десятків молекул хпДНК) [5].

Вміст хпДНК у диференційній клітині листків шпинату, наприклад, становить $0,91 \times 10^{-12}$ г на клітину (тобто 21% від загальної кількості ДНК), тоді як яДНК – $3,43 \times 10^{-12}$ г на клітину; у горосі вміст хпДНК – $1,43 \times 10^{-12}$ г на клітину (12% від загальної кількості ДНК) і $10,5 \times 10^{-12}$ г на клітину яДНК [8].

Молекули мітохондріальної ДНК, як звичайно, більші від молекул хпДНК і складені з 200–250 тисяч пар нуклеотидів, до того ж, значні відмінності зафіксовані навіть у споріднених видів. За організацією молекули мтДНК вищих рослин, скоріше, близькі до ядерної, ніж до хпДНК. Загальна кількість молекул мітохондріальної ДНК у різних видів неоднакова.

Отже, у наукових дослідження використовують широкий спектр високоефективних методів виділення та очищення препаратів ДНК з рослин, який залежно від мети і завдань експериментаторів інколи зазнає модифікацій. За доомогою того чи іншого методу окремо або поєднанні можна одержати хороші за якістю препарати ДНК з вищих рослин, що належать до різних таксономічних груп.

Як свідчать сучасні літературні дані серед науковців простежується тенденція до модифікації методів виділення нуклеїнових кислот залежно від мети досліджень. Це стосується багатьох модельних об'єктів різних видів рослин, грибів, тварин, що можливо, пов'язано з новими методами аналізу, які останнім часом поширюються по всьому світі завдяки комп'ютерним технологіям.

1. *Генная инженерия растений*. М.: Мир, 1991. 408 с.
2. *Кирнос М. Д., Александрушкина Н. И., Ванюшин Б. Ф.* Апоптоз в клетках первого листа и колеотила проростков пшеницы: межнуклеосомная фрагментация генома и синтез «тяжёлых» олигосомного размера фрагментов ДНК // *Биохимия*. 1997. Т. 62. Вып. 8. С. 1008–1014.
3. *Лобов В. П., Даскалюк А. П., Скрипка Л. В., Тищенко Е. Н.* Организация нуклеотидных последовательностей ДНК растений. Киев: Наук. думка, 1986. 140 с.
4. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
5. *Мармур Д., Раунд Р., Шильдкраут К.* Денатурация и ренатурация дезоксирибонуклеиновой кислоты // *Нуклеиновые кислоты*. М.: Мир, 1965. С. 258–340.
6. *Одинцова М. С.* Структура и функция ДНК пластид // *Геном растений*. Киев: Наук. думка, 1988. С. 150–173.

7. *Остерман Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
8. *Полевой В. В., Саламатова Т. С.* Физиология роста и развития растений. Л.: Изд-во Ленинград ун-та, 1991. 240 с.
9. *Соколов М. В., Гродзінський Д. М., Сорочинський Б. В.* Порушення структурної цілісності ДНК насіння люпину (*Lupinus polyhyllus* Lindl.) під час старіння, індукованого хронічним опроміненням // Доп. НАН України. 2001. № 4. С. 155–160.
10. *Тищенко Е. Н., Топчий Н. Н.* Сайт-специфичность метилирования ДНК при старении листа сахарной свеклы // Физиология и биохимия культурных растений 2001. Т. 33. № 2. С. 170–175.
11. *Тищенко Е. Н., Топчий Н. Н.* Вариабельность метелирования ДНК проростков сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) // Укр. біохім. журн. 2001. Т. 73. № 2. С. 91–96.
12. *Топчий Н. М.* Деградація ДНК у процесі старіння листків цукрового буряка (*Beta vulgaris* L.) // Укр. біохім. журн. 2001. Т. 73. № 3. С. 116–120.
13. *Bhattacharya P., Pappelis A., Lee S.* Nuclear (DNA, RNA, histone and non-histone protein) and nucleolar changes during growth and senescence of may apple leaves // Mechanisms of Ageing and Development. 1996. Vol. 92. N 1. P. 83–99.
14. *Bianchi M., Viotti A.* DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize // Plant Molecular Biology. 1988. Vol. 11. N 2. P. 203–214.
15. *Bleecker A.* The evolutionary basis of senescence: method to the madness? // Current Opinion in Plant Biology. 1998. Vol. 1. N 1. P. 73–78.
16. *Burr K., Harper R., Linacte A.* One-step isolation of plant DNA suitable for PCR amplification // Plant Molecular Biology Rep. 2001. Vol. 19. P. 367–371.
17. *Diadema K., Baumel A., Lebris M., Affre L.* Genomic DNA isolation and amplification from callus culture in succulent plant, *Carpobrotus* species (Aizoaceae) // Plant Molecular Biology Reporter. 2003. Vol. 21. P. 173a–173e.
18. *Rogers H., Burns N., Parkes H.* Comparison of small-scale methods for the rapid extraction of plant DNA suitable for PCR analysis // Plant Molecular Biology Reporter. 1996. Vol. 14. N 2. P. 170–183.
19. *Widlak P.* Mechanizmy fragmentacji DNA I kondensacji chromatyny w komorkah ulegajacych apoptozie // Postepy biologii komorki. 2000. T. 27. N 4. P. 583–597.
20. *Yen Ch., Yang Ch.* Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants // Plant cell physiol. 1998. Vol. 39. N 9. P. 922–927.

MODERN METHODS OF ISOLATION DNA FROM THE HIGHER PLANTS

N. Topchii

*Taras Shevchenko National University of Kyiv
Volodimirs'ka St. 60, UA-01033 Kyiv, Ukraine
e-mail: topchii_nataliya@univ.kiev.ua*

Existing methods of isolation of the preparations DNA from vegetative cells which they are applied for carrying out of various experimental researches in different branches of biology are considered.

Key words: DNA, higher plants, methods, leaf, tissue.

Стаття надійшла до редколегії 22.03.05

Прийнята до друку 03.06.06