

УДК 634.8

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ГЕРБАРНЫХ ЛИСТЬЕВ *VITIS VINIFERA L.*

Звягин Андрей Сергеевич
к. б. н., старший научный сотрудник
Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия

Для выделения ДНК из гербарных листьев двух подвидов *V. vinifera subsp. sativa D.C.* и *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* были использованы два метода. ДНК из гербария выделить достаточно тяжело и тем более получить хорошего качества. Качество ДНК было проверено на спектрофотометре с помощью измерения уровня абсорбции при А260/280 нм. Результаты показали успешное использование СТАБ-метода № 2 для выделения ДНК из зрелых и высушенных виноградных листьев. Другой протокол не показал удовлетворительных результатов при амплификации ДНК

Ключевые слова: ВИНОГРАД, ПОДВИДЫ, ДНК, ГЕРБАРНЫЕ ЛИСТЬЯ, ИЗМЕНЧИВОСТЬ, СТАБ-МЕТОДЫ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

UDC 634.8

EXTRACTION OF DNA FROM HERBARIUM LEAVES *VITIS VINIFERA L.*

Zvyagin Andrey Sergeevich
Cand. Biol. Sci., senior researcher scientists
Kuban State Agrarian University,
Krasnodar, Russia

Two methods were used for DNA extraction from herbarium leaves of two subspecies: *V. vinifera subsp. sativa D.C.* and *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* DNA extraction is difficult from herbarium leaves plants because of the presence of metabolites that interfere with DNA isolation procedures and downstream applications such as DNA restriction, amplification, and cloning. The quality of DNA was checked on a spectrophotometer by measuring the level of absorption at A260/280 nm. The results showed the successful extraction from mature and dried leaves of DNA when using the CTAB-method №2. Another method hasn't shown satisfactory results in amplification of DNA

Keywords: GRAPES, SUBSPECIES, DNA, HERBARIUM LEAVES, VARIABILITY, CTAB-METHODS, GENETIC DIVERSITY

Введение¹

Евразийский виноград *Vitis vinifera L.* - широко возделываемая и экономически важная культура в мире. Для его исследований необходимо подключать на молекулярно-генетическом уровне новые методы анализа. Для них необходимо найти простые и удобные способы выделения ДНК из разнообразных источников.

Сложным материалом для экстрагирования ДНК из винограда являются вызревшие и гербарные листья. Гербарные образцы, заготовленные длительное время назад, требуют определенной степени подготовки.

Наличие гербарных коллекций делает их потенциально важным источником материала для филогенетических исследований. Конечно, свежие или замороженные растительные образцы лучше подходят, так как

¹ Выражаю благодарность научному руководителю проф. Л.П. Трошину за консультативную помощь в выполнении данной работы.

содержат большее количество ДНК, однако появляется возможность выделить и проанализировать растения возрастом более чем 100 лет и которые, возможно, уже нельзя встретить в природе [6, 8, 18, 21].

Вопрос выделения ДНК стоит очень серьезно перед дальнейшим анализом гербарных образцов. Удовлетворительное качество ДНК необходимо для успеха всего молекулярного исследования. Наибольшее количество ДНК содержат листья. Поэтому для выделения ДНК из сухих образцов обычно требуется некоторая модификация, так как используется меньшее количество образца [17].

Также влияет степень подготовки гербария: высушивание и хранение на стеллажах в коробках. Если образцы высушены при температуре выше 42⁰ С, то они содержат большее количество высокомолекулярной ДНК: скорость сушки влияет на сохранение нуклеиновых кислот, поэтому необходимо сушить растения как можно быстрее. Также лучше использовать воздушную сушку, чем сохранять образцы в силикагеле или CaSO₄. Обычно старый материал, высушенный в специальной воздушной камере, который не был обработан химически или высокой температурой, содержит ДНК хорошего качества, поэтому ее легче экстрагировать [15, 20].

Немало важным является количество обработок коллекции: способ дезинфекции, тип химикатов и порядок обработки. ДНК будет серьезно деградирована в листьях, которые были пересушены или обработаны химическими растворами путем погружения в них на длительное время [4, 7, 8]. Способы фумигации изменяются с течением времени [12], поэтому достаточно тяжело быть уверенным в степени влияния их на качество ДНК. Деградация у гербарных образцов наблюдается в основном в первые годы, когда однолетние листья молодые и свежие [16]. Другим аспектом является то, что каждая культура имеет свои особенности. Для винограда - это присутствие большого количества полифенольных компонентов [10, 2,

9, 1] и полисахаридов [13, 5]. Они ограничивают экстракцию ДНК из листьев, отсюда – соответственно, данные методы могут использоваться только на определенных образцах и при определенных условиях отбора растительного материала [14].

В статье приводится исследование, которое являлось частью проекта по изучению культурного и дикого винограда на Северном Кавказе, для которого необходимо было развить простые и эффективные методы выделения ДНК с целью использования ее в молекулярно-генетических изысканиях.

Цель исследования - оценка разнообразных методов выделения ДНК, экстрагированной из разных источников и определение ее качества для молекулярно-генетических исследований винограда.

Материалы и методы

Виноградные образцы были собраны на территории Северного Кавказа. Тестировались два подвида: культурный виноград *V. vinifera subsp. sativa* D.C. и его дикий предок *V. vinifera subsp. silvestris* Gmel. (96 образцов).

Листья были собраны в разные сроки (взрослые и высушенные), однолетние и шестилетние (замороженные) и гербарные образцы. Для сравнения количества ДНК по разным методам использовали одно и то же количество для каждого образца – 1 г для свежего материала, для гербарных листьев количество пробы было уменьшено до 0,1 - 0,5 г [19].

Были протестированы следующие методы выделения ДНК: СТАБ-метод, разработанный для винограда [11]; СТАБ-метод выделения ДНК из виноградных листьев, модифицированный с использованием PVPP [19].

1) **СТАБ-метод № 1, разработанный для выделения ДНК из винограда [11].**

2) Растворы для выделения:

•Экстракционный буфер: 20 мМ соль EDTA и 100 мМ Tris-HCl, pH 8.0 с HCl, добавить 1.4 М NaCl и 2,0% (к общему объему) СТАВ (цетилтриметиламониум бромид). Растворить СТАВ путем нагревания до 60° С. Хранить при 37° С. Добавить 0,2% β-меркаптоэтанола только перед использованием.

•Хлороформ : спирт 24:1.

•5 М NaCl.

•TE-буфер: 10 мМ Tris-HCl и 1 мМ EDTA, pH 8.0 и проавтоклавировать.

•Рибонуклеаза А (Sigma R9009: 10 мг/мл).

Протокол выделения

1. Добавить 1000 мл экстракционного буфера и перемешать на вортексе.

2. Добавить 5 мг поливинилпирролидона (PVP) (Sigma, P6755) и перевернуть несколько раз.

3. Инкубировать при 60° С 25 минут и охладить до комнатной температуры.

4. Добавить 6 мл хлороформ:спирт и перемешать тщательно 20-25 мин.

5. Отцентрифугировать при 6000 оборотах 15 мин при комнатной температуре.

6. Перенести верхнюю фазу в новую пробирку.

7. Повторно промыть раствором хлороформ:спирт.

8. Добавить 0.5 объема 5 М NaCl и перемешать.

9. К объему раствора добавить холодный (-20°C) 95% спирт и поставить в холодильник ($4-6^{\circ}\text{C}$) на 15-20 мин, пока не появятся белый осадок.

10. Отцентрифугировать при 3000 оборотах в течение 3 мин, затем увеличить скорость до 5000 оборотов - 3 мин при комнатной температуре. Эти шаги нужны для того, чтобы белый осадок больше скопился на дне пробирки.

11. Вылить надосадочную жидкость (супернатант) и промыть осадок холодным ($0-4^{\circ}\text{C}$) 76% этанолом.

12. Центрифугировать при 13000 оборотах – 1 мин и вылить надосадочную жидкость.

13. Высушить в течение 37°C 20-30 мин.

14. Растворить осадок в 200 мкл TE.

15. Добавить 1 мкл рибонуклеазы А к 100 мкл ДНК раствора и инкубировать 37°C в течение 15 минут.

16. Определить качество ДНК на спектрофотометре при длине волны A260.

17. Положить при -70°C на длительный период хранения и -20°C на короткий период хранения.

3) СТАБ-метод № 2 выделения ДНК из виноградных листьев, модифицированный с использованием PVPP [19].

Растворы для выделения:

- Экстракционный буфер: 20 мМ соль EDTA и 100 мМ Tris-HCl, 8.0 рН доводим HCl, добавить 1.4 М NaCl и 2,0% (к общему объему) СТАВ (цетилтриметиламониум бромид). Растворить СТАВ нагрев до 60°C . Хранить при 37°C . Добавить 0,2% β-меркаптоэтанола только перед использованием;

- 3М Na Acetate;
- 4М NaCl;
- Хлороформ:спирт 24:1;
- 5 М NaCl;
- 2-изопропанол;
- Рибонуклеаза А (Sigma R9009: 10 мг/мл);
- ТЕ-буфер: 10 мМ Tris-HCl и 1 мМ EDTA, pH 8.0 и проавтоклавировать.

Протокол выделения

1. Подготовить необходимое количество буфера для экстракции ДНК (непосредственно перед выделением), нагреть до 60⁰ С: для этого использовать 2,5% СТАБ буфер (1М Tris-HCL) + (1% от объема буфера) В-меркаптоэтанолом (все работы проводить под вытяжкой).
2. Растереть 100 мг молодых листьев винограда (2 апикальных меристемных листочка) с жидким азотом и добавить 1-2% поливинилпирролидина (PVPP) в сухом виде в пробу (нерастворенный более эффективен, чем PVP), затем добавить 810 мкл СТАБ-буфера с В-меркаптоэтанолом, перемешать и поместить в водяную баню, нагретую до 60⁰ С на 20-30 мин.
3. Перемешивать пробы каждые 5-10 минут.
4. Охладить пробы до комнатной температуры и добавить 810 мкл (24:1 объем:объем) хлороформ:изоамиловый спирт.
5. Перемешать в течение 2-3 минут на вортексе.
6. Поставить перемешиваться в течение 20-30 мин на шейкере.
7. Снять с шейкера, открыть и закрыть пробирки под вытяжкой для удаления накопленных газов.
8. Центрифугировать в течение 15 мин при 13000-15000 оборотах.
9. Переместить супернатант (верхняя фаза, около 600 мкл) в новую пробирку объемом 1,5 мл.

10. Добавить 50 мкл 3М NaAcetate, 150 мкл 4М NaCl и 540 мкл холодного изопропанола.
11. Перемешать в течение 2 мин и поместить в холодильник при температуре -20° С на 30 минут или более (возможно оставлять на данном этапе на 10 и более часов).
12. Центрифугировать в течение 15 мин при 13000 оборотах.
13. Промыть с использованием 500 мкл 70% спирта.
14. Центрифугировать в течение 2 мин при 13000 оборотах и удалить жидкую фазу.
15. Высушить в сушильном шкафу при температуре 37° С в течение 10-20 минут.
16. Разбавить осадок путем добавления 300 мкл TE и 1 мкл РНказы (10 мг\мл стоковый раствор).
17. Поставить в сушильный шкаф при температуре 37° С на 1 час.
18. Добавить 100 мкл. 10М NH_4 Ацетат и 1000 мкл холодного этанола.
19. Перевернуть несколько раз пробирки и положить на -80° С на 5 минут в холодильник.
20. Центрифугировать в течение 10 мин при 13000 оборотах.
21. Удалить жидкую фазу и промыть с использованием 500 мкл 70% спирта.
22. Высушить в сушильном шкафу при температуре 37° С в течение 10-20 минут до полного удаления спирта.
23. Разбавить осадок либо в 50 мкл TE, либо в стерилизованной воде.

Результаты исследований

Качество ДНК было оценено спектрофотометром при длине волны 260\280 нм абсорбционным рангом (Nanodrope 2000). Спектральный

уровень продуктов (A 260/280 и, в некоторых случаях, A 260/230) коррелировал с качеством амплификации ДНК, давая оценку качества чистоты ДНК в образце. Однако, остаточное содержание солей и РНК, загрязняющие и вторичные растительные метаболиты, могут снизить количество ДНК и неправильно быть оцененными с помощью данного метода. Это связано с тем, что данный метод является не совсем удачным для оценки маленького количества ДНК (<1 нг/мл), потому что считается, что денситометрические методы являются не способными определить маленькое содержание ДНК в пробе [3].

В ходе исследования оба метода позволили выделить ДНК из исследуемых образцов независимо от возраста растительного материала и способа хранения ДНК (рис. 1).

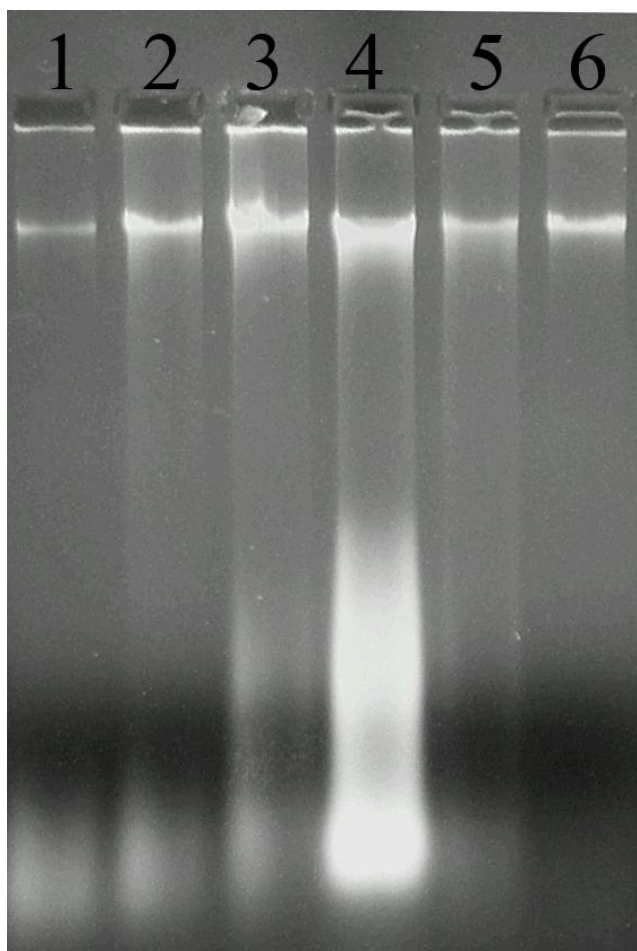


Рис. 1. - Сравнение методов выделения ДНК разными способами.

Оба метода оказались эффективными для выделения ДНК из гербарных листьев винограда, однако, существует ряд ограничений.

Для определения качества ДНК ее амплифицировали с использованием 6 нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров: VRTAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VVS2 [www.vitis.com]. Праймерные пары, фланкирующие указанные микросателлитные локусы, были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол», Россия (рис. 2).

ДНК, выделенная из 96 растений, хорошо проявилась при исследовании на агарозном геле. В случае использования метода № 1 ДНК была сильно загрязнена полифенолами и белковыми веществами – дорожки 3, 4. Поэтому использование PVPP в методе № 2 является необходимым условием и позволяет связывать полифенольные вещества и получать ДНК высокого качества. PVPP добавляли, как в буфер для экстрагирования, так и в сухом виде в пробирки в начале экстрагирования. Без использования PVPP ДНК была коричневого цвета, что является доказательством присутствия высокого содержания полифенольных компонентов.

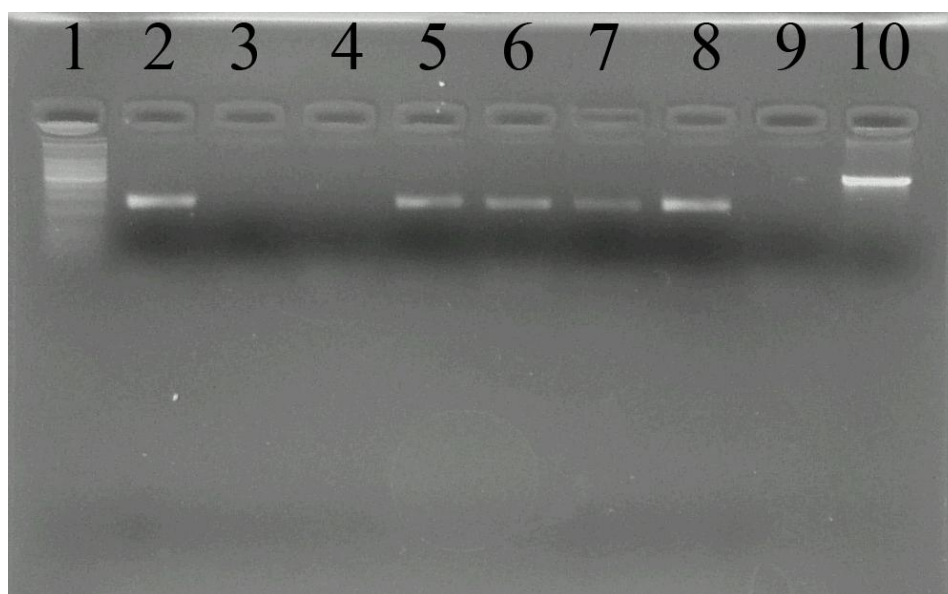


Рис. 2. – ПЦР-амплификация экстрагированной ДНК.

ДНК амплифицировалась при использовании метода № 2 – дорожки 2, 5, 6, 7, 8 и полностью не амплифицировалась при использовании метода выделения № 1.

В ходе работы в методе выделения № 2 использовали одноразовую очистку ДНК с использованием раствора хлороформ изоамиловый спирт. В ходе исследования двухразовая очистка резко снижает количество ДНК в образце, поэтому рекомендуется промывать один раз.

Также на конечном этапе было замечено, что ДНК, которая была растворена в воде, а не в растворе ТЕ из свежих листьев, лучше амплифицировалась, чем из гербарных и, наоборот, из гербарных - лучше в растворе ТЕ.

Выводы

Таким образом, ДНК из гербарных листьев винограда лучше выделять с использованием метода № 2, так как он позволяет получать высокого качества ДНК.

Чистота ДНК при спектрофотометрическом анализе 96 растений показала удовлетворительные результаты: средний коэффициент абсорбции при длине волны A_{260}/A_{280} нм варьировал в пределах от 0,98-1,56. Количество ДНК варьировало в пределах 0,057-0,450 мг/г к свежему весу.

Метод № 1 [11], показал удовлетворительные результаты при выделении ДНК из гербарных листьев, но ДНК из выделенных образцов была сильно загрязнена и поэтому требует дальнейшей очистки.

При этом чистота ДНК при спектрофотометрическом анализе 96 растений показала следующие результаты: средний коэффициент

абсорбции при A260/A280 нм варьировал от 0,67 до 0,92. Количество ДНК варьировало в пределах 0,044-0,320 мг/г к свежему весу.

Список литературы

1. Collins G.G. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure /Collins G.G., Symons. R.H. // Plant Mol. Biol. Rept. – 1992. №10. P. 233-235.
2. Couch, J.A. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics/ Couch, J.A., P.J. Fritz // Plant Mol. Biol. Repr. – 1990. № 8. P. 8-12.
3. Csaikl U.M.1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies / Csaikl U.M., Bastian H., Brettschneider R., Gauch S., Meir A., Schauerte M., Scholz F., Sperisen C., Vornam B. and Ziegenhagen B. // Plant Mol. Biol. Rep., - 1998. - №16. P. 69–86.
4. Bacci M. Microwave drying of herbarium specimens /Bacci M., Checcuccii A., Checcuccii G., Palandri M.R.// Taxon.- 1983. № 34: 649-653.
5. Fang, G. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA// Bio.Techniques. -1992. №. 13. P. 52-56.
6. Golenberg E.M. Isolation, identification, and authentication of DNA sequences derived from fossil material /Golenberg E.M.// Fossil Plants and Spores: Modern Techniques: The Geological Society. - London. 1999. P. 156–160.
7. Hall D.W. Microwave: a method to control herbarium insects / Hall D.W.// Taxon. – 1981. № 30. P. 818-819.
8. Hill S.R. Micowave and the herbarium specimen: potential dangers /Hill S.R. // Taxon. – 1983. № 32. P. 614-615.
9. Howland D.E. A method of extraction of DNA from birch/ Howland D.E., Oliver R.P. and Davy A.J. // Plant Mol. Biol. Rep.- 1991. №9. P. 340-344.
10. Katterman F.R.H. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of Gossypium species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins /Katterman F.R.H., Shattuck. V.I. // Preparative Biochem. - 1983. №13. P. 347-359.
11. Lodhi M. A. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, Vitis species and Ampelopsis. / Lodhi M. A., Guang-Ning Ye, Norman F. Weeden and Bruce I. Reisch.// Plant Molecular Biology Reporter. – 1994. №12(1). P. 6-13.
12. Metsger D.A. Managing the modern herbarium, an interdisciplinary approach / Metsger D.A., Byers S.C. // Society for the preservation of natural history collections, - 1999. P. 384.
13. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight DNA /Murray M.G. and W.F. Thompson. // Nucleic Acids Res. -1980.№ 8.P.4321-4325.
14. Porebski S. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components / Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. // Plant Mol. Biol. Rep. 1997. №15. P. 8-15.
15. Ristaino J.B. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens / Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R. // Nature. – 2001. № 411(6838). P. 695-697.
16. Rogers S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium, and mummified plant tissue / Rogers S.O., Bendich A.J. // Plant Mol Biol, 1985.- № 5. P. 69-76.
17. Rogers S.O. Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA / Rogers S.O. // Conservation of plant genes II: Utilization of ancient and modern DNA. Miss. Bot. Gard., Monogr. 1994. Vol. 48.

18. Soltis P.S. Ancient DNA: Prospects and limitations / Soltis P.S., Soltis D.E. // *New Zealand Journal of Botany*. - New Zealand, 1994. - №31. P. 203-209.

19. Storchova H. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in NaCl/CTAB solution / Storchova H., Hrdlickova R., Chrtek J., Tetera M., Fitze D., Fehrer J. // *Taxonomy*. – 2000. № 49. P. 79–84.

20. Wittzell H. Chloroplast DNA variation and reticulate evolution in sexual and apomictic sections of dandelions / Wittzell H. // *Mol. Ecol.*, 1999.- № 8. P. 2023-2035.

21. Zaveska D.L. Mitochondrial DNA variation within Juncaceae: Comparison of impact of organelles regions on phylogeny / Zaveska Drabkova L., Vlcek C. // *Pl. Syst. Evol.* – 2009. № 278. P. 169-186.

01.02.2010