



УДК 577.2.08

© 2009

О. І. Мартиненко, Т. К. Кириленко, О. Г. Алхімова

## Новий експрес-метод виділення та очищення сумарних препаратів ДНК та РНК з рослин

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

*Описано простий і швидкий метод виділення та очищення інтактних сумарних препаратів нуклеїнових кислот (НК) з рослин. Метод ґрунтується на проведенні одночасного руйнування клітин, екстракції НК та їхнього очищення у присутності хлороформу та спеціально розробленого гіпертонічного буфера, який містить, крім стандартних компонентів, комплекс неіонних ПАВ з гідратованим пероксидом. Отримані препарати ДНК і РНК характеризуються високим ступенем очищення та придатністю до Саузерн- і Нозерн-аналізу. Запропонований метод забезпечує вихід НК не менше 70% її кількості, що міститься у вихідному матеріалі.*

Зростання попиту на високоякісні препарати нуклеїнових кислот (НК) зумовлено, насамперед, значним розширенням сфери їхнього застосування в різних галузях науки і виробництва: фундаментальних дослідженнях (біологія, космобіологія, молекулярна медицина, фармакологія), сільському господарстві (виведення високопродуктивних генетично модифікованих рослин і тварин), новітніх напрямках сучасної біо- та нанотехнології (генна інженерія, біосенсори, виробництво напівпровідників (нові матеріали) та засобів біоінформатики). Відмітною тенденцією сьогодення є розробка підходів до препаративного отримання НК у промислових масштабах [1].

Практична необхідність пошуку нових ефективних способів одержання НК зумовлена труднощами, що виникають при виділенні інтактних препаратів НК з різних біоб'єктів, особливо з рослинного матеріалу. Справа в тому, що клітини цього типу характеризуються низьким сумарним вмістом НК та високою нуклеазною активністю, наявністю чималої кількості білків, вуглеводів, пігментів та інших клітинних агентів, позбавитися від яких часто буває дуже складно [2, 3].

Одним із критеріїв якості препаратів НК є висока полімерність молекул. У процесі виділення ступінь деградації цих біополімерів спричинений як дією клітинних нуклеаз, гідродинамічними впливами на цілісність молекул, так і біологічним віком вихідного біоматеріалу. Відомо, що онтогенез будь-якого організму супроводжується неминучим процесом

його старіння, внаслідок чого в клітинах відбувається поступова фрагментація ДНК [4, 5]. Це значно знижує вихід високополімерної НК і потребує певної стандартизації біооб'єктів, які використовують для отримання НК.

Найважливішим етапом виділення НК є їхнє очищення. Нині широко застосовують методи депротейнізації, які ґрунтуються на використанні фенолу. Проте застосування цього хімічного агента для еукаріотів у багатьох випадках призводить до втрати певних класів нуклеотидних послідовностей ДНК, а також до значного зниження виходу цих біополімерів [6, 7].

На сьогодні розроблено великий арсенал методів одержання якісних препаратів НК, проте серед них не існує жодного, який міг би претендувати на універсальність. Тому ми ставили собі за мету розробити альтернативні шляхи отримання та очищення високоякісної НК із “проблемного” рослинного матеріалу.

**Матеріали та методи дослідження.** В експериментах використовували листя видів рослин маку *Papaver* (*P. nudicaule*, *P. somniferum*) та проростків пшениці *Triticum*.

Кількісний вміст одно- та дволанцюгових НК у рослинних тканинах визначали модифікованим методом [8], який ґрунтується на здатності одностанцюгових НК повністю гідролізуватися 0,5 М КОН при 67 °С, а дволанцюгових — 0,5 М НСІО<sub>4</sub> при 90 °С. Вміст НК у відповідних фракціях вимірювали за допомогою спектрофотометра “Specord M-40” (“Carl Zeiss”, Німеччина) стандартним способом.

Лізис рослинних клітин, екстракцію та очищення препаратів НК проводили спеціально розробленим нами буфером: 6% сахароза; 25 мМ ЕДТА; 40 мМ *трис*-НСІ, рН 8,0; 0,3 М натрію ацетат; 4% Triton X-100; 0,25 — 3% Vanish (комплекс неіонних ПАР з гідратованим пероксидом).

Виділення НК зводилося до таких операцій.

Зразок рослинної тканини (1 г) ретельно розтирали в рідкому азоті, швидко перенесли в суспензію, що містила по 5 мл буфера та хлороформу, інкубували гомогенну суміш 30 хв при кімнатній або підвищеній температурі з наступним центрифугуванням (10000 г, 15–20 хв) до повного розділення фаз. При необхідності відібрану водну фазу додатково депротейнізували рівним об'ємом хлороформу і повторювали цю процедуру до повного зникнення інтерфазу на межі водної фази і хлороформу. НК осаджували 2,5 об'ємами етанолу, промивали 70% спиртом та зберігали при –20 °С. Розділення молекул ДНК і РНК здійснювали у ТЕ-буфері за допомогою LiCl [9] або РНКазу і ДНКазу відповідно.

Для порівняння виділяли НК відомим способом [10] з використанням буфера STTEN (6% сахароза; 4% Triton X-100; 40 мМ *трис*-НСІ, рН 7,5–8,0; 40 мМ ЕДТА; 0,9 — 1 М NaCl).

Концентрацію НК та їхні спектрофотометричні характеристики визначали за допомогою спектрофотометра “Specord M-40” (“Carl Zeiss”, Німеччина) відомим методом [11].

Електрофорез сумарних препаратів НК у 0,8% агарозному гелі і ТВЕ-буфері (рН 8,0) та гібридаційні експерименти здійснювали відповідно до рекомендацій [12].

Мічення ДНК (фрагмент гена рибосомної 18S РНК щура) дигоксигеніном-dUTP (DIG), а також її наступну детекцію методом хемілюмінесценції здійснювали за протоколом “Boehringer Mannheim” (Німеччина).

**Результати дослідження та їхнє обговорення.** З метою оцінки ефективності запропонованого способу, а також оптимізації умов селекції рослин як потенційних джерел широкомасштабного отримання НК ми застосували інформативний кількісний критерій, який відображає ступінь деградації молекул ДНК безпосередньо в рослинних тканинах у процесі онтогенезу [13]. Така процедура дозволила відібрати найпроблемніший вихідний

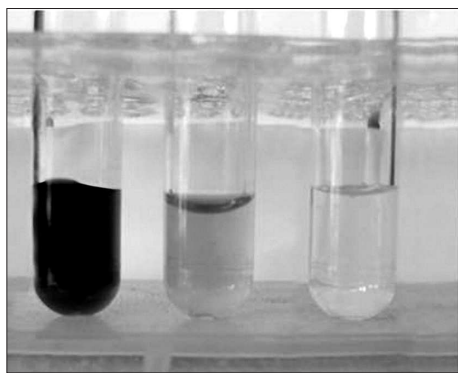


Рис. 1. Ефективність очищення препаратів НК *P. nudicaule*, отриманих відомим (1) та запропонованим методом при кімнатній (2) і підвищеній до 50 °С (3) температурі

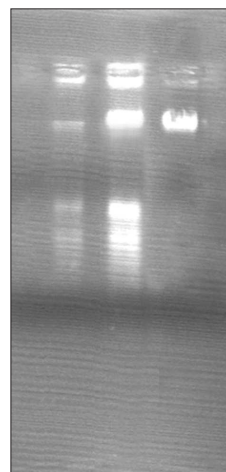


Рис. 2. Електрофореграма в 0,8% агарозному гелі сумарних препаратів ДНК і РНК, отриманих запропонованим методом з проростків пшениці (1) та маку (2), ДНК фага λ (3)

рослинний матеріал для опрацювання запропонованого способу виділення НК. Серед усього спектра досліджених рослин (маку та пшениці) лише листя *P. nudicaule* з числовим показником, що становив 3,5–4,7, використовували у подальшій роботі. Відібрані рослинні тканини *P. nudicaule* характеризувалися, з одного боку, ще значним вмістом нативної, хоча і частково деградованої ДНК, а з іншого — присутністю в рослинних екстрактах великої кількості клітинних агентів, здатних специфічно модифікувати молекули НК, значно ускладнюючи процес їхнього виділення і очищення.

Пропоновані умови одержання високоочищених препаратів рослинної ДНК виявилися значно ефективнішими за відомі методи. Це пов'язано, на нашу думку, з тим, що експериментально винайдений унікальний склад буфера в комбінації з підвищеною температурою розчину дозволяє максимально оптимізувати процес виділення та очищення якісних препаратів ДНК (рис. 1). Так, присутність у розробленому нами буфері комплексу детергентів (Тритон Х-100, неіонних ПАВ) забезпечує не тільки м'який та ефективний лізис клітин, але разом із солями (0,3 М натрію ацетат), хлороформом та антиоксидантом (гідратований пероксид) дає можливість значно інтенсифікувати і прискорити тривалий процес неруйнівного очищення молекул від білків, пігментів та інших клітинних домішок. Наявність сахарози дозволяє при лізисі рослинних протопластів запобігти миттєвій внутрішньоклітинній механічній деградації молекул НК і активації ендогенних нуклеаз. Для пригнічення нуклеазної активності буфер, крім названих вище сполук, містить також хелати (ЕДТА).

Порівняльний аналіз виходу нативних препаратів ДНК з листя *P. nudicaule*, ізолюваних за умов двох незалежних способів — раніше розробленого нами [10] (контроль) та запропонованого в цій роботі, виявив переваги останнього. Згідно з експериментальними даними кількісний вихід ДНК, забезпечений модифікованим способом, становить 65–70% вмісту НК у рослинному матеріалі. До речі, запропонований спосіб, крім ДНК, гарантує також і стабільне отримання великої кількості високополімерних препаратів РНК з одного рослинного зразка.

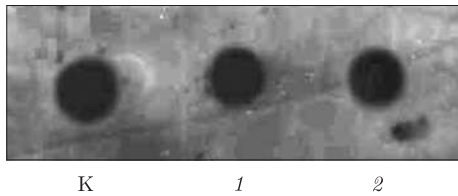


Рис. 3. Дот-гібридизація рекомбінантної плазмиди pRrB3, яка містить фрагмент гена 18S РНК щура (К), ДНК маку (1) та ДНК пшениці (2) з DIG-міченим фрагментом гена 18S рибосомної РНК щура

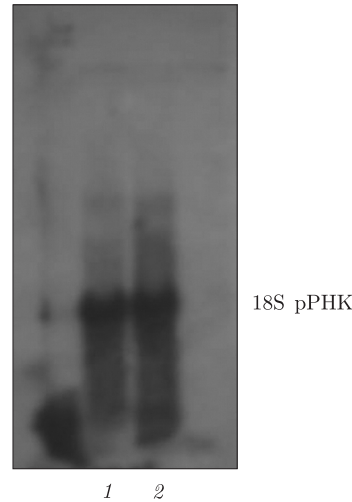


Рис. 4. Блот-гібридизація препаратів РНК з проростків маку (1) та пшениці (2) з DIG-міченим фрагментом гена 18S рибосомної РНК щура

Запропонований спосіб дозволяє отримувати тотальну високополімерну рослинну НК, про високий ступінь чистоти якої свідчить спектрофотометричний коефіцієнт  $A_{260}/A_{280} = 1,85-2,0$ .

Виділені препарати ДНК і РНК піддавали гель-електрофоретичному аналізу. Отримані електрофореграми демонструють характерну для інтактних молекул рухомість цих біополімерів у 0,8% агарозному гелі (рис. 2).

Описаний метод дозволяє отримувати сумарні препарати рослинної НК, придатні для гібридизаційних експериментів. Нами визначені рівні дот-гібридизації DIG-міченої ДНК (фрагмент гена рибосомної 18S РНК щура) з ДНК маку та пшениці (рис. 3) та блот-гібридизації цього ДНК-зонда з молекулами РНК проростків маку та пшениці (рис. 4).

Таким чином, запропонований експрес-метод одержання високополімерних препаратів НК має цілу низку переваг у порівнянні з відомими способами. Він простий і ефективний (вихід становить не менше 70% кількості, що міститься у вихідному матеріалі) та придатний для виділення НК з обмежених кількостей досліджуваного матеріалу, що дозволяє використовувати його у промислових масштабах. Завдяки мінімальній кількості маніпуляцій зі зразками та істотній економії часу він є рентабельним особливо в умовах експрес-аналізу великої кількості досліджуваних біологічних зразків. Відсутність необхідності у дорогих реактивах і обладнанні надають методів загальнодоступності.

1. *Материалы* Международной конференции “Биотехнология и бизнес” (Москва, 21–22 апр. 2003 г.). – Москва: Наука, 2003. – 957 с.
2. *Клонирование ДНК. Методы* / Под ред. Д. Гловера. – Москва: Мир, 1988. – 538 с.
3. *Simkova H., Cihalikova J., Vrana J. et al.* Preparation of high molecular weight DNA from plant nuclei and chromosomes isolated from root tips // *Biol. plant.* – 2003. – **46**, No 3. – P. 369–373.
4. *Гринюк І. І., Корнійчук Г. М., Капралов О. О., Матишевська О. П.* Зміни структурного стану хроматину в тимоцитах на ранньому етапі апоптозу за індукції пероксидом водню і радіацією // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 5. – С. 90–95.

5. *Тончий Н. М.* Деградація ДНК у процесі старіння листків цукрового буряка (*Beta vulgaris* L.) // Там же. – 2001. – **73**, № 3. – С. 116–120.
6. *Skinner D. M., Triplett L. L.* The selective loss of DNA satellites on deproteinization with phenol // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1967. – **28**, No 6. – P. 892–897.
7. *Черепенко Е. И., Галкин А. П., Лебедев В. Р., Кок И. П.* Щадящий метод выделения ДНК из ядер клеток насекомых // *Укр. биохим. журн.* – 1982. – **54**, № 3. – С. 316–321.
8. *Schmidt G., Thannhauser S. I.* A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues // *J. Biol. Chem.* – 1945. – **161**, No 1. – P. 83–89.
9. *Verwoerd T. C., Dekker M. M., Hoekema A.* A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs // *Nucl. Acids Res.* – 1989. – **17**, No 6. – P. 2362–2364.
10. *Мартыненко Е. И., Кириленко Т. К., Алхимова Е. Г.* Метод выделения ДНК из растений // *Доп. НАН України.* – 2004. – № 7. – С. 171–175.
11. *Henderson J. T., Benight A. S., Hanlon S.* A semi-micromethod for the determination of the extinction coefficients of the duplex and single-stranded DNA // *Anal. Biochem.* – 1992. – **201**, No 1. – P. 17–29.
12. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook C. S.* *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982. – 394 p.
13. *Мартыненко О. И., Кurylenko Т. К., Gorai A. A., Alkhimova O. G.* Quantitative RNA/DNA ratio as criterion for functional state of plant genomic DNA // *Укр. биохим. журн.* – 2005. – **77**, No 2. – С. 209.

*Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України, Київ*

*Надійшло до редакції 04.08.2008*

**О. И. Мартыненко, Т. К. Кurylenko, О. Г. Alkhimova**

### **A novel simple rapid method of DNA and RNA isolation from plants**

*A rapid simple procedure for the isolation of intact total plant nucleic acids is described. The method is based on the simultaneous cell disruption, extraction of nucleic acids, and their purification using chloroform along with a specially developed hypertensive buffer which contained a complex of nonionic SAS with hydrogen peroxide (commercial solution). Isolated total DNA and RNA are intact and of high purity. The plant nucleic acids isolated using our procedure are suitable for the Northern and Southern analysis. The method proposed supplied the nucleic acids yield as much as 70%.*