

Е.В. ГУЗЕНКО, В.А. ЛЕМЕШ, Л.В. ХОТЫЛЕВА

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Академическая ул., 27, Минск,
E-mail: guzenko@tut.by

ВЛИЯНИЕ РЕАМПЛИФИКАЦИИ ДНК НА РЕЗУЛЬТАТЫ RAPD-PCR



Представлены результаты проведения повторной амплификации (реамплификации) ДНК льна-долгунца с произвольными праймерами. Установлено, что 8 из 17 использованных декамерных праймеров обладали реамплификационным эффектом: увеличивалась интенсивность полос; появлялись новые полосы и/или новые полиморфные полосы на гелевом образце. Результаты свидетельствуют об эффективности и необходимости проведения реамплификации в случаях неопределенности или неоднозначности интерпретации результатов RAPD-анализа, что позволит более эффективно отбирать высокоинформативные праймеры.

© Е.В. ГУЗЕНКО, В.А. ЛЕМЕШ, Л.В. ХОТЫЛЕВА, 2006

Введение. В настоящее время применение молекулярных маркеров является одним из основных подходов в генетике растений, так как обеспечивает неограниченное число фенотипически нейтральных маркеров для изучения различных проблем как теоретического, так и практического характера. Использование молекулярных маркеров в практике биологических исследований делает возможным установление видовой и сортовой специфичности растений, а также определение таксономических взаимоотношений между отдельными представителями различных систематических групп (видов и других таксонов): Применение методов, основанных на полимеразной цепной реакции — PCR (Polymerase Chain Reaction), ускоряет и упрощает задачу выявления маркеров на основе ДНК. Использование в качестве матрицы небольшого количества исходной ДНК (от 10 до 100 нг) позволяет амплифицировать миллионы копий одного или нескольких ДНК-фрагментов. В зависимости от целей исследования можно выбрать любую разновидность праймеров для проведения PCR. В последнее время широко применяется амплификация ДНК с произвольными праймерами — RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [1]. Используя этот метод, можно достаточно быстро выявить варибельность большого числа локусов по всему геному. Возможность тестирования большого числа локусов одновременно позволяет сопоставлять значительные участки генома, что повышает точность сравнительного анализа и степень выявляемого с помощью RAPD-метода генетического полиморфизма. Наряду с явными достоинствами (анонимность последовательностей, незначительные количества ДНК, быстрота и экономичность технологии) этот метод обладает и недостатками, главный из которых состоит в строгом соблюдении оптимизированных условий реакции амплификации. Такие факторы, как концентрация матричной ДНК, концентрация ионов Mg^{++} , нуклеотидный состав, длина и температура отжига праймера, оказывают влияние на ход реакции амплификации и должны тщательно контролироваться для получения воспроизводимых результатов [2—4]. В некоторых экспериментах при использовании произвольных праймеров полиморфизм обнаружить не удается. Более того, иногда при сканировании агарозного геля

после проведения электрофоретического разделения фрагментов ДНК получают черный снимок, т.е. продукты амплификации отсутствуют. Часто такая ситуация возникает при проведении RAPD с геномной ДНК льна. Возможно, получению четких спектров амплификации мешает присутствие в некоторых образцах большого количества примесей полисахаридов, что характерно для выделенной ДНК льна. Введение процедуры дополнительной очистки органическими растворителями не влияет на результативность амплификации. В связи с этим мы попытались выяснить, влияет ли проведение повторной амплификации (реамплификации) ДНК на качество RAPD-PCR, т.е. на получение четких и воспроизводимых RAPD-профилей образцов льна.

Материалы и методы. В качестве материала для исследований использовали ДНК льна-долгунца (*L. usitatissimum*). Для выделения ДНК использовали листья (200 мг) двухнедельных проростков 7–15 растений, выращенных в лабораторных условиях на водопроводной воде при 16-часовом фотопериоде. Растительный материал измельчали в присутствии жидкого азота, суспендировали в экстракционном буфере следующего состава: 100 мМ трис-НСl, рН 8,5; 100 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА, рН 8,0; 2% SDS с добавлением протеиназы К (до конечной концентрации 0,05 мг/мл). Образцы инкубировали 1,5 ч при 65 °С при периодическом перемешивании. После экстракции фенол-хлороформовой смесью супернатант перенесли в другие пробирки. ДНК осаждали добавлением 0,6 объема изопропилового спирта с последующим центрифугированием. ДНК промывали в 70%-ном этиловом спирте, подсушивали и растворяли в ТЕ-буфере (10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 1 мМ ЭДТА). Растворенную ДНК обрабатывали РНКазой (10 мг/мл) 1 ч при 37 °С. Затем вторично очищали экстракцией в фенол-хлороформовой смеси и осаждали добавлением двух объемов этанола с последующим растворением в стерильном ТЕ-буфере. Полученную ДНК анализировали в 0,8%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300.

Для полимеразной цепной реакции использовали наборы реактивов производства Pro-

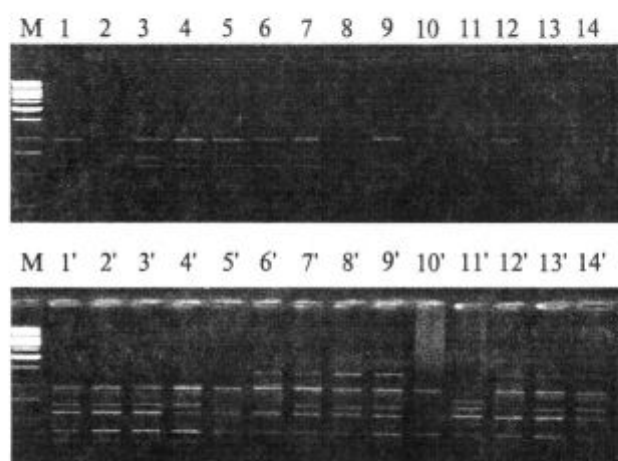


Рис. 1. Реамплификационный эффект. RAPD-профили, амплифицируемые праймером UBC542: 1–14 — ДНК образцов льна после амплификации (изображение очень слабое); 1'–14' — ДНК тех же образцов льна после реамплификации; М — маркер молекулярной массы (1 kb)

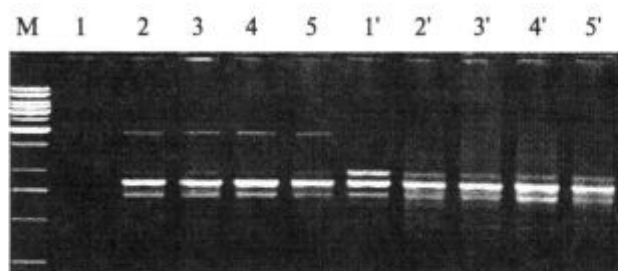


Рис. 2. Реамплификационный эффект. RAPD-профили, амплифицируемые праймером P28: 1–5 — ДНК образцов льна после амплификации (на первом образце продукты амплификации не проявились); 1'–5' — ДНК тех же образцов льна после реамплификации; М — маркер молекулярной массы (1 kb)

mega и Sigma-Aldrich. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 нг геномной ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ MgCl₂ и 1,5 ед Taq-полимеразы в инкубационном буфере. PCR проводили в амплификаторе БИС (Россия) в следующих условиях: цикл 1–3 мин при 94 °С; циклы 2–40 — 20 с при 94 °С, 15 с при 30 °С и 2 мин при 72 °С; цикл 41–10 мин при 72 °С.

Для реакции реамплификации использовали PCR-реакционный продукт первой амплификации (в качестве геномной ДНК). Реакци-

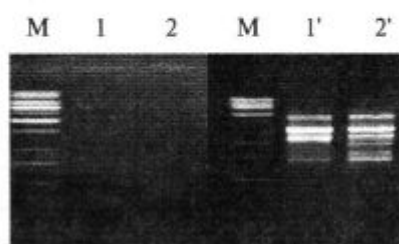


Рис. 3. Реамплификационный эффект. RAPD-профили, амплифицируемые праймером OPA06: 1, 2 — ДНК образцов льна после амплификации (полосы отсутствуют); 1', 2' — ДНК тех же образцов льна после реамплификации; М — маркер молекулярной массы (1 kb)

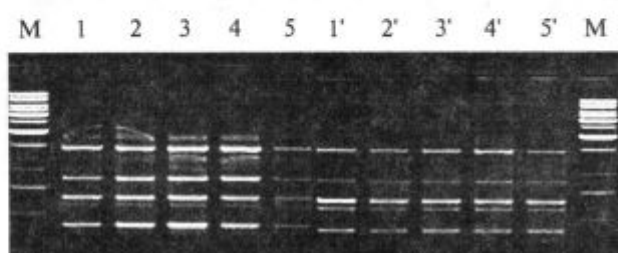


Рис. 4. Отсутствие реамплификационного эффекта. RAPD-профили, амплифицируемые праймером UBC180: 1—5 — ДНК образцов льна после амплификации; 1'—5' — ДНК тех же образцов льна после реамплификации; М — маркер молекулярной массы (1 kb)

Последовательность (5'-3')
и реамплификационный эффект
олигонуклеотидных праймеров

Праймер	Последовательность (5'-3')	Реамплификационный эффект
UBC180	GGG CCA CGC T	-
UBC601	CCG CCC ACT G	-
UBC244	CAG CCA ACC G	+
UBC140	GTC GCA TTT C	+
UBC365	TAG ACA GAG G	-
UBC542	CCC ATG GCC C	+
UBC101	GCG GCT GGA G	-
OPW17	GTC CTG GGT T	+
OPW08	GAC TGC CTC T	+
OPW13	CAC AGC GAC A	-
OPT08	GGA CGG CGT T	-
OPT05	GGG TTT GGC A	-
OPX20	CCC AGC TAG A	+
OPA06	GGT CCC TGA C	+
P28	CAA ACG TCG G	+
P43	AGT CAG CTG C	-
P44	GGA CCC CGC C	-

онная смесь объемом 25 мкл содержала 1 мкл продукта реакции амплификации в качестве матричной ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ MgCl₂ и 1,5 ед. Taq-полимеразы в инкубационном буфере.

Реамплификацию проводили в амплификаторе БИС (Россия) по той же программе, что и амплификацию. Продукты амплификации и реамплификации разделяли электрофорезом в 1,8%-ном агарозном геле с добавлением этидиум бромид, документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера 1 kb DNA ladder (BRL).

Для RAPD-PCR использовали 17 декамерных праймеров, из них 7 праймеров серии UBC (University of British Columbia), 7 праймеров серии OP (Operon Technologies), 3 праймера, синтезированные фосфорамидитовым методом в Южном биотехнологическом центре УААН и МОН (Украина).

Результаты исследований и их обсуждение. Изучено влияние процедуры реамплификации для того, чтобы установить, изменяется ли продуктивность полимеразной цепной реакции в сторону увеличения фрагментов в RAPD-спектрах образцов льна. Ранее аналогичный эффект был установлен в отношении ISSR-праймеров [5]. Известно, что количество единичных нитей ДНК из реакционной смеси первого цикла амплификации уменьшается после реамплификации, что позволяет избежать неверного истолкования полос полиморфизма [6]. Установлено, что при включении реамплификации в стандартный протокол ISSR-PCR можно наблюдать следующие возможные эффекты: количество и концентрация продуктов PCR не увеличивается [7]; мазки продуктов реакции вместо индивидуальных полос [5]; заметно увеличивается концентрация продуктов амплификации, т.е. наблюдается более высокая интенсивность полос [8—10]; появляются новые полиморфные полосы [11].

Из 17 использованных праймеров 16 праймеров инициировали амплификацию, 1 праймер не был эффективен. После проведения реамплификации четко прослеживаются сле-

дующие реамплификационные эффекты по RAPD-образцам. Добавление процедуры реамплификации приводило к увеличению интенсивности полос (рис. 1), а также к появлению новых полос и/или новых полиморфных полос на гелевом образце при сравнении второго цикла с первым (рис. 1 и 2).

В случае появления новых фрагментов и/или новых полиморфных фрагментов праймеры были классифицированы как обладающие реамплификационным эффектом (таблица). Они составили 47 %. Такой высокий процент объясняется в данном случае тем, что для реамплификации мы в основном использовали праймеры, с которыми не получили четких RAPD-профилей.

Отмечен случай (праймер OPA06), когда на RAPD-образце полностью отсутствовали полосы после проведения амплификации, т.е. продукты амплификации с данным праймером не проявились. После проведения реамплификации получено четкое изображение полос (рис. 3).

Праймеры классифицировали как не обладающие реамплификационным эффектом, когда новые полосы отсутствовали (рис. 4).

На основании полученных данных можно утверждать, что некоторые праймеры обладают реамплификационным эффектом, и целесообразно включать процедуру реамплификации в стандартный протокол RAPD-PCR, так как это уточняет картину генетического полиморфизма. В противном случае существенная доля генетических RAPD маркеров не проявляется.

В наших исследованиях при использовании 17 праймеров добавление реамплификационного цикла в протокол RAPD-PCR увеличило общее количество ампликонов в 1,8 раза, причем количество полиморфных фрагментов увеличилось в 2,7 раза. Это подтверждает эффективность и необходимость процедуры реамплификации в случаях неопределенности или неоднозначности интерпретации результатов RAPD-анализа. По-видимому, эффект реамплификации можно объяснить тем, что при реамплификации, вероятно, происходит уменьшение количества неспецифических фрагментов ДНК, которые накапливаются среди продуктов амплификации [8].

Таким образом, добавление процедуры реамплификации в стандартную методику RAPD-PCR делает более эффективным отбор высокоинформативных праймеров и расширяет возможности RAPD-анализа в изучении генетической изменчивости растений и идентификации генотипов.

SUMMARY. The results of reamplification of flax DNA with random primers are represented. It was shown that eight of 17 decameric primers used in the experiments had an reamplification effect: the intensity of the bands increased; new bands and/or new polymorphic bands appeared in the gel sample. The results confirm the effectiveness and necessity of reamplification in case of uncertain or ambiguous interpretation of RAPD analysis making possible to select the highly-informative primers.

РЕЗЮМЕ. Представлено результати проведення повторної ампліфікації (реампліфікації) ДНК льонувовгунця з довільними праймерами. Встановлено, що 8 з 17 використаних декамерних праймерів володіли реампліфікаційним ефектом: збільшувалася інтенсивність смуг; з'являлися нові смуги і/або нові поліморфні смуги на гелевому зразку. Результати свідчать про ефективність і необхідність проведення реампліфікації у випадках невизначеності або неоднозначності інтерпретації результатів RAPD-аналізу, що дозволить більш ефективно відбирати високоінформативні праймери.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Welsh J., McClelland M.* Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — **18**, № 24. — P. 7213—7218.
2. *Penner G.A.* RAPD analysis in plant genomes // *Methods of genome analysis in plant.* — 1996. — **9**. — P. 252—268.
3. *Devos K.M., Gale M.D.* The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1992. — **84**. — P. 567—572.
4. *Karp A., Edwards K.J., Bruford M., Funk S., Vosman B., Morgante M., Seberg O., Kremer A., Boursot P., Arctander P., Tautz D., Hewitt G.M.* Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges // *Nature Biotechnology.* — 1997. — **15**. — P. 625—628.
5. *Hengen P.N.* Reamplification of PCR fragments // *Trends Biochem. Sci.* — 1995. — **20**. — P. 124—125.
6. *Arnau J., Housego A.P., Oliver R.P.* The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant-pathogenic fungus *Cladosporium fulvum* // *Cur. Genet.* — 1994. — **25**. — P. 438—444.

7. Nath K., Sarosy J.W., Hahn J., Di Como, Ch. J. Effect of etidium bromide and SYBR GreenI on different polymerase chain reaction systems // *J. Biochem. Biophys. Meth.* — 2000. — **42**. — P. 15–29.
8. Pierre C., Lecossier D., Boussougant Y., Bocart D., Joly V., Yeni P., Hance A. J. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA // *J. Clin. Microbiol.* — 1991. — **29**. — P. 712–717.
9. Chairprasert A., Prammanan T., Samerpitak K., Pattanakitsakul S., Yenjitsomanus P., Jearanaisilawong J., Charoenratanakul S. Direct detection of *M. tuberculosis* in sputum by reamplification with 16S rRNA-based primer // *Asia-Pacif. J. Mol. Biol. Biotech.* — 1996. — **4**. — P. 250–259.
10. Wang H., Xia Z.B., Wang Y. H., Li C.H., Sun L.Y. Recovering and reamplifying of the differentially expressed cDNA bands isolated from mRNA differential display — a modified method // *Mol. Biotechnol.* — 1998. — **9**. — P. 171–173.
11. Wiesner I., Wiesnerova D. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns // *Cell. Mol. Boil. Lett.* — 2003. — **8**. — P. 743–748.

Поступила 04.01.06