Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение

высшего профессионального образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

**РЕФЕРАТ**

Методы извлечения ДНК из древесных тканей некоторых хвойных Сибири

Преподаватель И.Е. Суковатая

Студент ББ12-02М М.М. Крылова

Красноярск 2013

Оглавление

[ВВЕДЕНИЕ 2](#_Toc377129549)

[Выделение ДНК из древесины 3](#_Toc377129550)

[Этапы выделения ДНК 5](#_Toc377129551)

[СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 11](#_Toc377129552)

# ВВЕДЕНИЕ

Вырубка и деградация лесов продолжают оставаться основными угрозами глобальному биоразнообразию и приносят огромный ущерб окружающей среде. Современные генетические методы могут быть использованы в качестве инструментов борьбы с данными проблемами.

Большинство древесных лесных видов показывают высокий уровень генетического разнообразия, который может быть использован для того, чтобы отследить происхождение живых растений до их продуктов, таких как древесина и обработанные древесные изделия. Недавний прогресс в выделении ДНК не только из живой ткани, но и из древесины предлагает новые возможности для проверки документов, подтверждающий происхождение древесины или саженцев. Тем не менее, так как большинство древесных популяций слабо дифференцированы, поиск генетических маркеров для дифференциации пространственно изолированных популяций зачастую занимает много времени и средств.[[1]](#endnote-2)

Идентификация видов с использованием молекулярных инструментов в особенности важна для близкородственных таксонов, которые сложно определить с помощью других методов.[[2]](#endnote-3) Идентификация древесины необычайно важна для современной лесной индустрии. Также она имеет важные области применения в криминалистике, археологии и экологических исследованиях. [[3]](#endnote-4)

По сравнению с количеством ДНК, содержащейся в мягких растительных тканях, таких как листья, почки и фрукты, которые являются обычными источниками, используемыми молекулярными биологами, количество ДНК, сохранившейся в древесине, очень маленькое. Тем не менее, «посмертная» деградация ДНК в древесине более ограничена. Поэтому древесная ДНК является лучшим кандидатом для применения в археологии и криминалистике.[2]

## Выделение ДНК из древесины

Выделение ДНК— важный шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие приложения, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, клонирование, секвенс, гибридизация, синтез ДНК и т. д., не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот. При выборе метода необходимо учитывать приоритет предъявляемых к нему требований, таких как высокий выход нужной нуклеиновой кислоты, быстрота метода, большая

пропускная способность или высокое качество продукта. Существуют различные методы, позволяющие выделять нуклеиновые кислоты из широкого спектра образцов, но лишь малое их число пригодно для автоматизации и на многих стадиях выделения есть высокий риск контаминации. [[4]](#endnote-5)

Качество выделенной ДНК является ключевым фактором, который определяет успех проведения многих экспериментальных процедур. Основными препятствиями при выделении ДНК из древесины могут стать:

1. Физические. Древесина является твердой растительной тканью. Поэтому требуется механическое воздействие, такое как сверление или перемалывание, чтобы получить кусочки древесной ткани, содержащие волокна, сосуды и паренхиматические ткани с неповрежденной ДНК и ДНК фрагментами. В процессе необходимо избегать чрезмерного нагревания ткани, которое может привести к необратимой деградации молекул ДНК.

2. Химические. Многие химические составляющие древесины могут ингибировать выделение ДНК или привести к её низкому выходу, делая непригодной для проведения ПЦР. Высокое содержание полисахаридов – одна из самых часто встречающихся проблем при выделении ДНК. Высокая вязкость полисахаридов вызывает трудности при пипетировании, а также мешает активности таких ферментов, как рестриктационные эндонуклеазы, лигазы и полимеразы. Полифенолы, присутствующие во многих растительных объектах, при гомогенизации тканей вступают в реакции окисления, ковалентно связываются с белками и нуклеиновыми кислотами, осадок ДНК становится коричневым, такие образцы ДНК непригодны для дальнейших исследований. Фенольные соединения могут ингибировать активность соответствующих ферментов в последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР).[[5]](#endnote-6) В связи с этим существует достаточно много модификаций протоколов выделения ДНК, которые основном направлены на удаление из смеси полисахаридов, полифенолов и других окислителей. [[6]](#endnote-7) Значительно различающийся состав метаболитов представителей различных таксонов, а иногда даже представителей одного рода растений, к сожалению, не предполагает одного оптимального протокола изолирования ДНК.

3. Биологические. Разложение древесины грибами и микроорганизмами приводит к деградации древесной ДНК и возможному загрязнению древесины чужеродной ДНК от этих организмов. Контаминация древесины чужеродной ДНК происходит в поверхностных слоях древесины в процессе долгого хранения и особенно нежелательна при методиках, использующих универсальные маркеры.

4. Вылеживание древесины. Дегенерация ДНК начинается сразу после смерти растительной клети, а в случае с древесиной, это происходит и до, и после срубки дерева. Размер фрагментов, которые можно будет амплифицировать и исследовать, продолжает уменьшаться после смерти соответствующей древесной ткани. [[7]](#endnote-8)

## Этапы выделения ДНК

Большинство опубликованных докладов о выделении ДНК используют протоколы выделения, основанные на СТАВ методе[[8]](#endnote-9) или коммерческие наборы выделения ДНК.[[9]](#endnote-10) Поскольку свойства древесины отличаются от «зеленого» материала, протоколы, использующиеся для выделения ДНК из мягких свежих тканей могут потребовать некоторых модификаций.

В целом, процедура выделения ДНК включает обязательные процедуры:

• разрушение клеток;

• удаление мембранных липидов;

• удаление вторичных метаболитов и запасных веществ;

• удаление белков;

• удаление РНК;

• осаждение ДНК.

Первый этап – разрушение клеток, лизис. В отличие от клеток животных, растительные клетки окружены прочной целлюлозной клеточной стенкой. Многие методы, используемые для её разрушения, приводят к сильной фрагментации ДНК. Часто приходится находить компромисс между размером ДНК и её количественным выходом, ведь молекулы ДНК – самые крупные полимерные биомакромолекулы. Активная физическая гомогенизация тканей должна разрушить клеточные стенки и нарушить целостность клеток и внутриклеточных компарментов с целью освобождения компонентов этих компартментов, выделения их в экстракционный буфер. Физическое разрушение тканей осуществляется или растиранием в ступке, либо с использованием микродробилки или блендера (microtube grinder) .

Гомогенизация тканей в присутствии сурфактантов, детергентов (поверхностно активных веществ), хаотропных агентов способствует высвобождению мембранных липидов, белков и лизису клеток. Выбор детергентов зависит от целей исследования. Анионные детергенты, например (SDS, SLS, sarkosyl), в буферных растворах дезорганизуют двухслойные липидные образования мембран, разрушают нековалентные связи и солюбилизируют (переводят в растворимое состояние) белки, тем самым разрушаются липидно-белковые комплексы мембран, в том числе ядерных, при этом ДНК экстрагируется в буфер, т.е. переходит в растворимое состояние. Реже используются неионные детергенты, такие как Triton X-100, но так как они более «мягкие», белки могут оставаться интактными, функциональными. Классический катионный сурфактант, используемый при экстракции ДНК, цетилтриметил бромид аммония (СТАВ) лизирует клеточную стенку. Додецилсульфат натрия (SDS), а также меркаптоэтанол, (концентрации которых могут варьировать) осаждают белки и полисахариды как нерастворимый комплекс.[[10]](#endnote-11) Меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и четвертичной структуры и действует как биологический антиоксидант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК. Поскольку наличие дисульфидных мостиков поддерживает стабильность нуклеаз, меркаптоэтанол элиминирует активность этих, освобождаемых при лизисе клеток, ферментов. Буфер экстракции может содержать дитиотрейтол (DTT), который также как и меркаптоэтанол является сильным редуцирующим (восстанавливающим) агентом. В качестве антиоксиданта используется также аскорбиновая кислота. Присутствие ДТТ способствует разрушению дисульфидных связей, предотвращая образование димеров «тиолированной» ДНК в растворе. Однако даже ДТТ не может восстановить скрытые (недоступные раствору) дисульфидные связи. Высокие температуры, присутствие 6М гуанидингидрохлорида, 8М мочевины или 1% СДС способствуют этому восстановлению. Следует учитывать, что ДТТ окисляется на воздухе, поэтому его хранят при –20оС и в инертной атмосфере.

Нагревание и хаотропные агенты, присутствующие в буфере экстракции, такие как соли, денатурируют макромолекулы, нарушая водородные связи, гидрофобные взаимодействия, силы Ван дер Ваальса. Высокие концентрации солей осаждают, например, полисахариды, которые в противном случае, могут образовывать с ДНК желеобразный комплекс.

В присутствии в буфере экстракции ЭДТА, хелатирующего агента, связывающего ионы металлов (Mg2+, Ca2+, Fe3+ и др.), происходит дезактивация металл-зависимых ферментов, находящихся в растительных экстрактах, в том числе нуклеаз, разрушающих ДНК.

Растительные объекты характеризуются накоплением в определенных органах, частях растений большого количества вторичных метаболитов (в первую очередь это относится к ароматическим и лекарственным растениям), которые оказывают существенное негативное влияние на процедуры изолирования и последующего использования ДНК. Содержащиеся в буфере экстракции полимеры поливинилпирролидон (PVP) или поливинилполивинилпирролидон (PVPP, модификация PVP с поперечными сшивками) связываются с фенолами, мешая образованию их комплексов с ДНК.

Известно, что ДНК в клетке находится не только в ядерном компартменте, но в митохондриях и хлоропластах, и в каждом из компартментов ДНК связана с соответствующими высокоспецифичными белками. Так, степень связывания участков ядерной ДНК с белковыми комплексами зависит от транскрипционного статуса этих участков, транскрипционно неактивная ДНК наиболее плотно «упакована» с соответствующими белками, представляя структуру гетерохроматина.

Поэтому следующий важный этап – удаление белков с помощью протеаз. Щелочные протеазы гидролизуют белки, в том числе гистоны, связанные с ДНК, ферменты клеточного содержимого, в том числе нуклеазы. В качестве примера можно привести широко применяемую протеиназу К, которая эффективно инактивирует нуклеазы, будучи устойчивой при этом к денатурирующим (СДС, мочевина), хелатирующим (ЭДТА) и сульфгидрильным агентам, а также к ингибиторам трипсина и хемотрипсина. Данная протеаза работает в широком диапазоне рН (4-12). Более того, денатурирующие агенты повышают доступность пептидных связей белков для протеиназы К.

Белки также могут быть осаждены солями: ацетатом аммония, натрия, калия или до осаждения ДНК экстрагированы смесью фенол/хлороформ.

Большие количества РНК в образцах ДНК могут связывать Mg2 и тем самым снижать активность ДНК полимеразы в ПЦР и, следовательно, количество продукта реакции. РНК может быть удалена на соответствующем этапе осаждением хлоридом лития, или добавлением РНКазы к растворенному в воде осадку нуклеиновых кислот. Инкубация при 37ºC способствует гидролизу РНК в образцах. Затем ДНК должна быть осаждена и переосаждена спиртом, так как мелкие фрагменты РНК после обработки РНКазой могут послужить «затравками» в ПЦР реакции.

Нуклеиновые кислоты из экстракционного буфера зачастую осаждают охлажденным во льду этанолом или изопропанолом, поскольку полярные молекулы ДНК нерастворимы в неполярном спирте. Следует помнить, что концентрация спирта при переосаждении не должна быть меньше 70% во избежание потерь ДНК.

Если в осажденном концентрированном экстракте ДНК все еще присутствуют ингибиторы ПЦР, может быть использована смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт; при этом смесь разделяется на фазы: водный раствор, в котором содержатся нуклеиновые кислоты, в интерфазе вода/фенол содержатся белки и углеводы, липиды растворяются в фазе хлороформ/изоамиловый спирт. Водный экстракт переносится в чистую пробирку, и нуклеиновая кислота может быть осаждена 3М ацетатом натрия, с последующим промыванием осадка в спирте (100, 70% этанол). К сожалению, фенол, хлороформ и изоамиловый спирт – токсичные соединения и требуют утилизации после использования, поэтому их применение становится все менее привлекательным. Коммерческие наборы для выделения ДНК не содержат токсичные фенол и хлороформ, но при выделении ДНК из большого количества образцов лимитирующим фактором оказывается стоимость.

Для облегчения процедуры отделения ДНК от вторичных метаболитов часто применяются процедуры очистки с помощью силиконового матрикса или ионообменной хроматографии. Силиконовый матрикс связывает ДНК в присутствии высоких концентраций хаотропных солей, таких как гуанидингидрохлорид, которые разрушают гидрофобные взаимодействия. По определению исследователей, метод имеет два преимущества: дешевизна силикон диоксида и универсальность протокола для широкого приложения для очистки ДНК из растительных объектов [9]. Процедура от гомогенизации ткани до элюции геномной ДНК занимает немного более получаса. ДНК или продукты рестрикции из ПЦР смеси освобождаются на 70-80% в зависимости от размеров фрагментов, продукты с агарозного геля – до 68%. Но очистку небольших ДНК фрагментов <50 пар оснований осуществить не удается, поскольку эти фрагменты прочно связываются с матриксом, не элюируются и не осаждаются в смеси этанол/изопропанол. 1 млг силикон диоксида способен связать до 3-4,5 мкг ДНК и в таком состоянии стабильность ДНК сохраняется до 12 месяцев. Очевидно, что количество используемого силикагеля зависит от предполагаемого количества ДНК в исходном материале; ДНК отделяется от силикагеля при понижении концентрации соли, а также быстрым центрифугированием (10 сек.); либо ДНК может быть отмыта небольшим объемом (от 5 мкл) воды, облегчить элюцию можно нагреванием. Предлагаемый метод прост, быстр и экономичен, не требует специальных колонок и оборудования, что делает его привлекательным при большом объеме образцов в экспериментах. Силикагель включается во многие коммерческие наборы (Kits) экстракции ДНК. Тем не менее, метод имеет и определенные недостатки.

Ионообменная хроматография осуществляется с помощью связывания положительно заряженной смолы в колонке с негативно заряженными ДНК и РНК. Элюция с матрикса проводится понижением концентрации соли. Протеины и РНК при низких концентрациях соли легко отделяются от матрикса, в то время как ДНК более прочно связана с носителем и элюируется при более низких концентрациях. Количество носителя и молярность соли зависят от целей эксперимента. Основным недостатком хроматографии является стоимость, тем не менее, данный метод незаменим в диагностических целях, так как позволяет получить очень чистые препараты ДНК.

Поскольку геномная ДНК является очень длинной полимерной цепью, в процессе ее выделения необходимо избегать чрезмерного пипетирования и грубого встряхивания.

# СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Finkeldey Reiner, Leinemann Ludger and Gailing Oliver** Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants [Journal] // Appl Microbiol Biotechnol. - [s.l.] : Springerlink.com, 2010. - 85:1251–1258. [↑](#endnote-ref-2)
2. **Nuroniah H. S., Gailing O. and Finkeldey R.** Development of SCAR Markers for Species Identification in The Genus Shorea (Dipterocarpaceae) [Journal] // Silvae Genetica. - 2010. - 59 : Vol. 6 [↑](#endnote-ref-3)
3. **Tang Xiaoshu, Zhao Guangjie and Ping Liyan** Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA [Journal] // Plant Mol Biol. - [s.l.] : Springer Science+Business Media B.V., 2011. - 77:609–617. [↑](#endnote-ref-4)
4. **Антонова О. С. [и др.]** Эффективные методы виделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) [Журнал] // Научное приборостроение. - Санкт-Петербург : Институт аналитического приборостроения РАН, 2010 r.. - 1 : Т. 20. - стр. 3-9. [↑](#endnote-ref-5)
5. **Рябушкина Н. А., Омашева М. Е. and Галиакпаров Н. Н.** Специфика выделения ДНК из растительных объектов [Journal] // Биотехнология. Теория и практика.. - 2012. - 2. [↑](#endnote-ref-6)
6. **Valledor L. [et al.]** RNA-free DNA Extraction Protocol from Pinus Tissues for Molecular Biology or HPCE/HPLC Analyses [Journal] // J. Plant Biochemistry & Biotechnology. - July 2009. - 18(2). - pp. 229-232. [↑](#endnote-ref-7)
7. **Rachmayanti Yanti [et al.]** DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success [Journal] // Forensic Science International: Genetics. - [s.l.] : Elsevier, 2009. - 3. - pp. 185–192. [↑](#endnote-ref-8)
8. **Shepherd Lara D. and McLay Todd G.B.** Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue [Journal] // J Plant Res. - 2011. - pp. 311-314. [↑](#endnote-ref-9)
9. **Salzer K. [et al.]** Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in Pinus cembra L. [Journal] // PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE. - [s.l.] : Blackwell Publishing Ltd, 2009. [↑](#endnote-ref-10)
10. **Ahmed I. [и др.]** High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach [Журнал] // J Appl Genet. - 2009 r.. - 50(2). - стр. 105-107. [↑](#endnote-ref-11)