

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 575.22+577.21:582.912.46

ПОДБОР УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ISSR–ПЦР ДЛЯ СОРТОВОЙ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ (*VACCINIUM CORYMBOSUM*)

Н.В. ВОДЧИЦ, Е.О. ЮРЧЕНКО, А.А. ВОЛОТОВИЧ

*Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь, vodna76@mail.ru*

Введение. Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) является ценной ягодной культурой, имеющей длительную историю использования в пищевых и лекарственных целях. Благодаря уникальному комплексу антоцианов, пектинов, флавоноидов, витамина С, сырье из голубики выступает превосходным источником антиоксидантов, применяется как бактерицидное, противовоспалительное средство, для снижения уровня холестерина, лечения ревматоидных болезней [1]. В связи с высокой актуальностью этой культуры, возникновением нового направления в нашей стране – промышленного голубиководства, а также высокой востребованностью и эффективностью фармакологических субстанций из растительного сырья голубики, стоит задача сертификации сортности коллекционного и посадочного материала и коллекций *in vitro* на основе современных молекулярно–биологических и генетических методов, включая разработку протоколов проведения анализа и его стандартизацию. Создание генетического паспорта сорта является стратегической необходимостью при оценке качества растительного материала, в частности, для подтверждения сортности и стабильности генотипа при микроклональном размножении [1]. На сегодняшний день актуальным является использование ДНК–технологий для дифференциации генетического материала [2]. Среди современных методов анализа генетического полиморфизма применяются различные модификации ПЦР, в том числе ISSR–PCR (inter simple sequence repeats analysis, или межмикросателлитный анализ ДНК) [3]. Особый интерес в этом отношении представляют ДНК–маркеры, которые представлены многолокусными пробами (фингерпринтами). Именно они используются для уникальной характеристики как индивидуумов, так и целых популяций [2]. Значительный уровень полиморфизма, выявляемый с использованием молекулярных маркеров, свидетельствует об их высокой информативности и определяет возможность их использования при оценке генетической изменчивости между сортами и для идентификации сортов. Молекулярные маркеры, ассоциативно связанные с генами, отвечающими за хозяйственно ценные признаки растений, позволяют с повышенной достоверностью проводить отбор на уровне индивидуального растения или селекционной линии [4].

В настоящей статье приведены результаты исследования влияния концентраций ионов магния, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ) и ДНК–матрицы на выход ПЦР–продукта при ISSR–маркировании образцов трех сортов голубики высокорослой.

Методика и объекты исследования. Исследования проводились на базе УО «Полесский государственный университет» в научно–исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии в 2014 году.

Объектом исследования были двухлетние растения сортов ‘Northblue’, ‘Reka’ и ‘Bluescop’ голубики высокорослой, произведенные микроклонально в научно–исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве Полесского государственного университета и выращенные в ЧУП «Плантарум» (д. Добрая Воля Пинского района).

Выделение ДНК проводились ЦТАБ–методом [5], с небольшими модификациями применительно к объекту исследования. ДНК изолировали из 0.03 г листьев каждого сорта, без очистки РНКазой. Препарат ДНК растворяли в деионизированной воде объемом 50, 100, либо 150 мкл, в зависимости от количества осадка. Растворы ДНК хранили при –20°C.

ПЦР–ISSR проводили с использованием праймера UCB 818, в 25 мкл смеси. В первой серии экспериментов смесь содержала 1× ПЦР–буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 в диапазоне концентраций 1–5 мМ, 0.125 мМ смесь дНТФ, 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*–полимеразы. Во втором случае реакционная смесь содержала 1× ПЦР–буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 мМ MgCl_2 , смесь дНТФ в диапазоне концентраций 100–200 мкМ, 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*–полимеразы. В тре-

твом случае смесь включала 1× ПЦР–буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 мМ MgCl_2 , 0.125 мМ смесь дНТФ, 20 пмоль праймера, ДНК–матрицу в количественном диапазоне 10–50 нг, 2 ед. *Taq*–полимеразы (все реагенты производства «Праймтех», Беларусь, за исключением смеси дНТФ типа Roti–Mix PCR 3 производства Carl Roth, Германия). Реакцию проводили на термоциклере Biometra TP Basic Gradient (Германия) по программе: 94°C – 30 сек; 40 циклов: 94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; 72°C – 5 мин.

ПЦР–продукт оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, в трис–боратном буфере, при стартовом напряжении 90 В и основном напряжении фореза 50–60 В, в течение 50 мин. В гель наносили 6 мкм раствора после ПЦР, смешивая его предварительно с 2 мкм загрузочного красителя состава бромфеноловый синий + глицерин. Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель–документирования Quantum ST4, в результате связывания ДНК с бромистым этидием, который вносился в гель (5 мкг/мл) до его застывания.

Результаты и их обсуждение. При проведении амплификации основными компонентами реакционной смеси являются: буфер для ПЦР (включающий Трис–НСI и одну из солей – КСI либо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), MgCl_2 , смесь дНТФ, праймеры (олигонуклеотиды), термостабильная ДНК–полимераза, препарат анализируемой ДНК. Каждый из компонентов реакционной смеси непосредственно участвует в полимеразной цепной реакции, а концентрация реагентов напрямую влияет на ход амплификации [6].

Хлорид магния применяется в диапазоне концентраций 0.5–5 мМ. При ПЦР мононуклеотиды связывают магний в молярном соотношении 1:1, но на практике результаты ПЦР не будут оптимальны при концентрации магния равной или менее чем общая концентрация свободных нуклеотидов. В реакционной смеси требуется в среднем в 2 раза большее количество ионов магния. Повышение концентрации реагента увеличивает выход продукта, но более высокими темпами понижает специфичность, т.е. повышает вероятность некомплементарной гибридизации праймеров и содействует ошибочным встройкам нуклеотидов. Кроме того, повышение концентрации Mg^{2+} повышает температуру плавления ДНК. При значительном избытке ионов магния (до 10 мМ) на 40–50% ингибируется *Taq*–полимераза. Понижение концентрации реагента вызывает пониженный выход ПЦР–продукта [7].

Нуклеозидтрифосфаты являются непосредственными мономерами нуклеиновых кислот. Для предотвращения терминации синтеза цепи рекомендуется равноколичественное соотношение всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов. Низкая концентрация данных компонентов реакционной смеси (10–20 мкМ) увеличивает вероятность ошибки при построении комплементарной цепи ДНК. Диапазон используемых концентраций составляет от 50 до 500 мкМ [6]. Повышенная концентрация дНТФ при нормальной концентрации MgCl_2 приводит к пониженному выходу ПЦР–продукта [7].

Количество и качество препарата ДНК–матрицы непосредственно влияет на ход и параметры полимеразной цепной реакции. Избыточное количество образца ДНК ингибирует ПЦР. Диапазон используемых концентраций в разных случаях таков: геномная ДНК эукариот – 10–500 нг, бактерий – 1–10 нг, плазмидная ДНК – 0.2–5 нг [6].

Оптимальная молярность компонентов подбирается опытным путем, по наличию хорошо читаемых и немногочисленных полос в продуктах ISSR–ПЦР [7].

В ходе выполнения работы, с целью получения наиболее насыщенных спектров продуктов амплификации, были оптимизированы концентрации ионов Mg^{2+} , дНТФ и матричной ДНК. Используемые препараты ДНК имели соотношение поглощения при $\lambda=260/280$ нм в среднем 1.82, что позволило судить об их хорошей очистке.

В первом случае мы исследовали влияние концентрации ионов магния на продукты ISSR–ПЦР. Были взяты пять вариантов концентрации MgCl_2 (на основе 50 мМ сток–раствора). Профили продуктов ISSR–ПЦР при увеличении концентрации ионов магния с 1.0 мМ до 5.0 мМ показаны на рисунке 1. При концентрации 1 мМ продукт не наблюдается вовсе. Далее прослеживается эффект увеличения числа ISSR–фрагментов при концентрациях 1.5 мМ, 2.0 мМ, 2.5 мМ, и снижение их числа при 5.0 мМ. При концентрации 2 мМ количество копий основных фрагментов выше, но число фрагментов на профиле меньше, чем при концентрации 2.5 мМ. В последнем случае, вероятно, увеличивается выход неспецифичных продуктов.

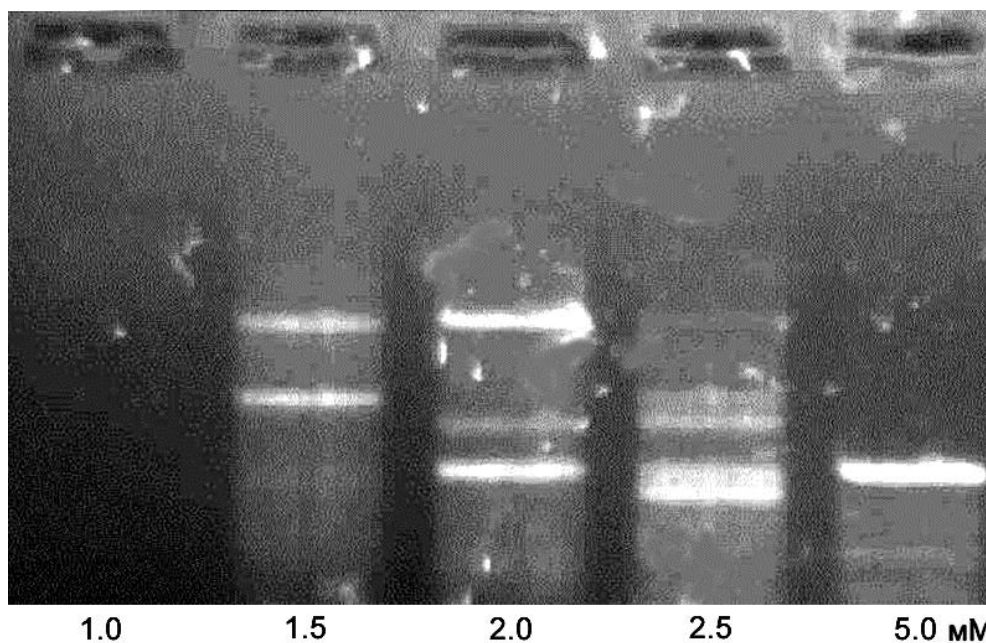


Рисунок 1 – Результаты ISSR–ПЦР для образца голубики сорта ‘Bluecrop’ при различных концентрациях $MgCl_2$

Во втором случае мы исследовали влияние концентрации дНТФ на продукты ISSR–ПЦР. Наилучший выход продукта среди вариантов эксперимента наблюдался при концентрации дНТФ 125 мкМ (рисунок 2). Повышение концентрации приводило к пониженному выходу ПЦР–продукта.

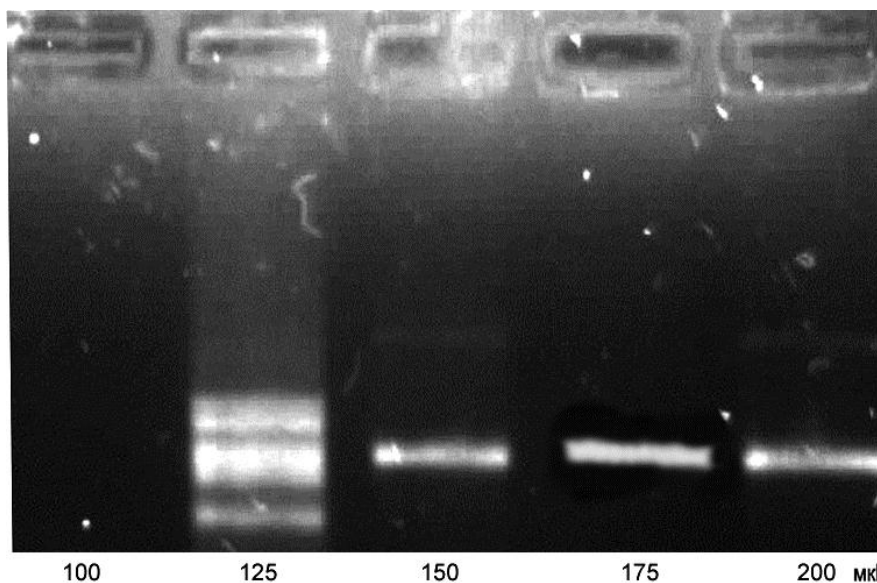


Рисунок 2 – Результаты ISSR–ПЦР для образца голубики сорта ‘Reka’ при различных концентрациях дНТФ

Для ПЦР готовят рабочий раствор ДНК–матрицы определенной массовой концентрации, разводя экстракт деионизированной водой. В третьем случае для ISSR–ПЦР мы применяли разные количества ДНК–матрицы (10–50 нг), выделенной из листа растения сорта ‘Northblue’. Отмечено достаточное количество ПЦР–продукта при исходном количестве ДНК 10 нг и 20 нг, с лучшим результатом в варианте 20 нг (рисунок 3). При увеличении количества матрицы более 20 нг наблюдался бедный или следовой ПЦР–продукт.

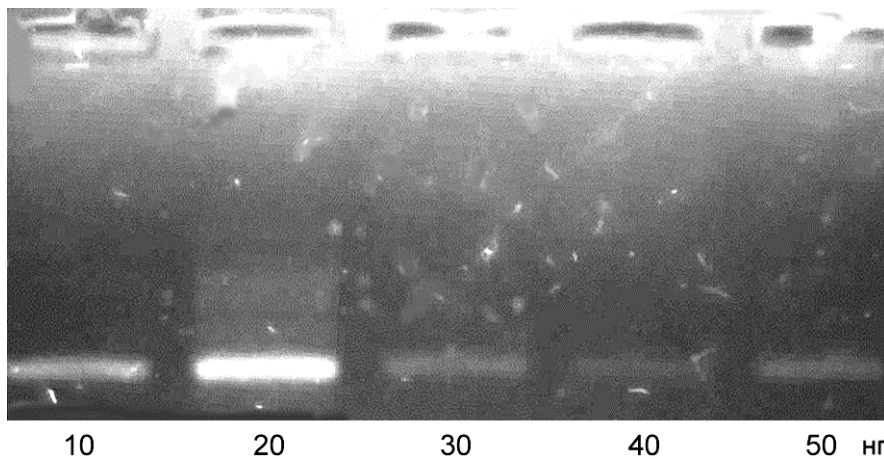


Рисунок 3 – Результаты ISSR–ПЦР для голубики сорта ‘Northblue’ при разном количестве ДНК–матрицы

Выводы. При ISSR–маркировании *Vaccinium corymbosum*, нами были установлены оптимальные условия для проведения полимеразной цепной реакции, которые обеспечивают достаточный выход ПЦР–продукта.

При объеме ПЦР–смеси 25 мкл наиболее результативными оказались концентрации $MgCl_2$ 2.0 и 2.5 мМ, с более информативным ISSR–профилем в варианте 2.5 мМ.

При исследовании эффекта количества смеси дНТФ было установлено, что наибольшее количество ISSR–фрагментов наблюдается при добавлении в реакционный объем 125 мкМ смеси четырех дНТФ.

При подборе подходящей массовой концентрации ДНК установлено, что оптимальное количество матрицы находится в диапазоне 10–20 нг для реакционного объема 25 мкл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власова, А.Б. Сертификация сортов голубики высокой (*Vaccinium corimbosum* L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD– и ISSR–маркеров / А.Б. Власова, А.Н. Юхимук, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников // Вісн. Укр. тов–ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 203–210.
2. Агабалаева, Е.Д. Проведение молекулярно–генетического анализа растений рода *Trigonella* с использованием RAPD– и ISSR–маркеров / Е.Д. Агабалаева, Е.В. Спиридович, И.Я. Нам // Овощеводство будущего: новые знания и идеи: Мат–лы Междунар. науч.–практ. конф. мол. ученых, посв. 125–летию со дня рождения Н.И. Вавилова. Москва, 16 августа 2012 г. / ГНУ Всерос. НИИ овощеводства Рос. акад. с.–х. наук; под ред. Р.А. Мещерякова. – М., 2012. – С. 33–36.
3. Киль, В.И. ДНК–полиморфизм популяций хлопковой совки и картофельной минирующей моли по ISSR–маркерам / В.И. Киль, Е.Н. Беседина // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: Мат–лы Междунар. научн.–практ. конф. Вып. 5. Краснодар, 23–25 сент. 2008 г. – Краснодар, 2008. – С. 415–420.
4. Хапилина, О.Н. Молекулярно–генетическая идентификация сортов мягкой пшеницы с использованием ретротранспозонов / О.Н. Хапилина, О.Б. Райзер // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 4. – С. 29–35.
5. Dempster, E.L. Rapid DNA extraction from ferns for PCR–based analyses / K.V. Pryor, D. Francis, J.E. Young, H.J. Rogers // Biotechnique. – 1999. – Vol. 27, No. 1. – P. 66–68.
6. Воропаева, А.Л. Алгоритм определения аллельных вариантов и генотипов *Helicobacter pylori* с использованием полимеразной цепной реакции: Инструкция по применению / А.Л. Воропаева, Е.В. Воропаев, О.Ю. Баранов [и др.]. – Гомель, 2008. – С. 36.
7. Юрченко, Е.О. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК: Практическое руководство / Е.О. Юрченко, М.Г. Синявская; Ин–т эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск: Право и экономика, 2007. – 101 с.

STUDY OF THE OPTIMAL CONDITIONS FOR ISSR-PCR IN MARKING OF *VACCINIUM CORYMBOSUM* CULTIVARS

N.V. VODCHITS, E.O. YURCHENKO, A.A. VOLOTOVICH

Summary

In the experiments, the effect of three variable factors in PCR mixture was assessed: concentration of MgCl₂, concentration of dNTP, and the amount of DNA template. The mixture was used for ISSR profiling of plants with primer UBC 818. The optimum parameters of PCR mixture were stated taking into account the higher number of ISSR fragments and sufficient amount of copies of each fragment. These parameters were (per 25 µl of mixture): 2–2.5 mM MgCl₂, 125 µM dNTP mix (1 : 1 : 1 : 1), 10–20 ng of DNA template.

Key words: *Vaccinium corymbosum* L., ISSR-PCR, cultivars, MgCl₂, dNTP, DNA, PCR- product.

© Водчиц Н.В., Юрченко Е.О., Волотович А.А.

Поступила в редакцию 2 октября 2014г.