

УДК 577.2

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-71-75

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК *NICOTIANA TABACUM* L., ОБОГАЩЕННОЙ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ САХАРОЗНОГО ГРАДИЕНТА

© А.Р. Кулуев, Р.Т. Матниязов, Ю.М. Никоноров, А.В. Чемерис

Для секвенирования хлоропластного генома растений существует необходимость в разработке специальных методов выделения ДНК. Примеси ядерной ДНК могут привести к ошибочным результатам секвенирования. В связи с этим разрабатываются все новые подходы для обогащения тотальной ДНК фракцией хлоропластной ДНК и контроля за чистотой препарата. Описывается оптимизация метода выделения хлоропластной ДНК с применением сахарозного градиента на примере модельного объекта *Nicotiana tabacum* L. Для этого было проведено выделение интактных хлоропластов и ядер из листьев табака. Выделенные хлоропласты были отделены от ядер и клеточных компартментов с помощью центрифугирования в сахарозном градиенте. Далее проведено предварительное отделение слоя неразрушенных хлоропластов с помощью специального насоса. Для оценки количества хлоропластной ДНК относительно тотальной (контроль) были использованы праймеры к уникальным ядерным и хлоропластным генам (представленным в одном экземпляре). Первая пара праймеров была подобрана к участку уникального ядерного гена *Ntpdr*, который кодирует белки, относящиеся к семейству АТФ связывающих транспортеров с плейотропной лекарственной устойчивостью (*PDR*) и вторая пара праймеров – к участку уникального хлоропластного гена *Npsb*, кодирующего основную часть протеинов, составляющих фотосистему II. Методом количественной ПЦР в реальном времени было показано примерно 40-кратное увеличение количества хлоропластной ДНК при одновременном уменьшении содержания ядерной ДНК после процедуры обогащения. Оптимизированный нами метод выделения хлоропластной ДНК может быть рекомендован для использования при пробоподготовке к полногеномному секвенированию пластома растений.

Ключевые слова: хлоропластная ДНК, пластом, сахарозный градиент, количественная ПЦР, полногеномное секвенирование.

Введение. Все больше исследований посвящено полногеномному секвенированию культурных растений. Результаты этих работ могут приблизить к пониманию филогенетических связей внутри родов и дать новый толчок для селекции, в частности для селекции пшениц. Наряду с такими методами, как получение полиэмбрионидов *in vitro* [1], создание адроклиных растений полиэмбриодогенного происхождения [2], особое место в селекции пшениц занимает полногеномное секвенирование хлоропластного генома. Этот метод может быть использован при определении цитоплазматического донорства при изучении гибридных и аллополиплоидных растений. Для секвенирования хлоропластного генома крайне важно, чтобы

не было примеси ядерной ДНК, так как размер ядерного генома больше хлоропластного примерно в 60–100 раз [3], и это может стать помехой при секвенировании пластома и биоинформационной обработке полученных массивов данных. Поэтому разрабатываются различные методы отделения неразрушенных хлоропластов на начальных этапах выделения ДНК. В основном во всех этих методах используются схожие буферы с сахарозой для предотвращения разрушения оболочек хлоропластов либо же вместо сахарозы используется сорбитол. Также в составе буфера входят НЕРЕС/КОН, ЭДТА, MgCl₂ (либо KCl), MnCl₂, спермидин-HCl, спермин-HCl, градиент плотности Percoll (вместо градиента плотности сахарозы). Отличие

КУЛУЕВ Азат Разяпович, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: azatpiter@mail.ru

МАТНИЯЗОВ Рустам Тахирович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: rmat@mail.ru

НИКОНОРОВ Юрий Михайлович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: niconorov@anrb.ru

ЧЕМЕРИС Алексей Викторович – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: chemeris@anrb.ru

между этими методами заключается в дальнейшем отделении хлоропластов и ядер с использованием специальных наборов, например TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) для деградации ядерной ДНК [4, 5]. В нашей работе описываются два таких метода с применением сахарозного градиента с последующим исследованием выделенной ДНК в ходе количественной ПЦР из растений *Nicotiana tabacum*.

Материалы и методы. Молодые зеленые листья табака (~15 г) растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния. Содержимое ступки переносили в 200 мл охлажденного HBS-буфера. HBS-сток: 0,1 М ТРИС-основание, 0,8 М KCl, 0,1 ЭДТА, 10 мМ спермидин-HCl, спермин-HCl. HBS-буфер: 1×HBS-сток, 0,5 М сахароза. pH 9.4–9.5, довели при помощи NaOH. Перед непосредственным использованием буфера добавляли в него β-меркаптоэтанол. Перемешивали около 30 мин на льду. Далее раствор переносили в центрифужные стаканы через два слоя фильтрующего материала, состоящего из вискозы-полиэстера с акриловым связующим (miracloth). Центрифугировали при 4°C 2 мин при скорости 2000 об/мин на центрифуге 5804R компании Eppendorf. Осадок растворяли в 25 мл HBS-буфера, чтобы уменьшить концентрацию сахарозы. Далее центрифугировали 15 мин при 5000 g [4]. Осадок аккуратно ресуспендировали при минимальном объеме (5–8 мл). Далее раствор переносили на заранее подготовленный градиент сахарозы. Для получения градиента сначала наливали в ультрацентрифужные пробирки 50% сахарозу, на нее наносили аккуратно 30% сахарозу. Раствор аккуратно наслаивали на градиент, не допуская перемешиваний. Центрифугировали 45 мин при 4°C и 10000 g на ультрацентрифуге Optima L-90K компании Beckman Coulter [5]. При этом формировался зеленый слой неразрушенных хлоропластов между слоями 50 и 30% сахарозы. Этот слой мы отбирали с помощью насоса Varioprepex II Pump компании LKB в пробирки. Полученные растворы концентрировали, добавляли в них Triton X-100 (0.15% от общего объема), вновь концентрировали и выделяли из них ДНК стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [7]. Также выделяли тотальную ДНК из листьев табака методом фенольно-хлороформной экстракции без предварительного

этапа отбора хлоропластов. С полученной ДНК проводили электрофоретический анализ, для проверки качества выделения. Далее проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия) для оценки количества хлоропластной ДНК относительно тотальной (контроль). Для этого мы использовали праймеры к уникальным ядерным и хлоропластным генам (представленным в одном экземпляре). Первая пара праймеров была подобрана к участку уникального ядерного гена *Ntpdr*, который кодирует белки, относящиеся к семейству АТФ связывающих транспортеров с плейотропной лекарственной устойчивостью (*PDR*) и вторая пара праймеров – к участку уникального хлоропластного гена *Ntpsb*, кодирующего основную часть протеинов, составляющих фотосистему II [8, 9]. Последовательности праймеров для ПЦР гена *Ntpsb*: NtpsbA1F 5'-ATTGGATGGTTTGGTGTTTG-3' и NtpsbA2R 5'-TAGCTGCAGAAGTAGGAATAATGG-3', для ПЦР гена *Ntpdr* NtpdrF1 5'-TAAGGGGTATTTTCAGGTGGAC-3' и NtpdrR2 5'-GCAACAGAGAAATAACAGCAGT-3'. В обоих вариантах ПЦР проводили при температуре отжига праймеров 53°C и 45 циклах амплификации.

Результаты и обсуждение. Собранные молодые листья табака были гомогенизированы в ступке жидким азотом до частиц порядка 1 мм шириной. После гомогенизации листьев табака были выделены неразрушенные хлоропласты и ядра с помощью буфера HBS. Неразрушенные хлоропласты были отделены от ядер с помощью сахарозного градиента и собраны специальным насосом. Собранные хлоропласты были обработаны Triton X-100 и из них выделена ДНК стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Одновременно выделяли ДНК из трех образцов листьев, то есть выборка составила 3 («химическая» повторность). Также из трех образцов листьев табака была выделена тотальная ДНК стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Далее был проведен сравнительный количественный ПЦР-анализ образцов тотальной ДНК, которые служили в качестве контроля и хлоропластной ДНК, выделенной с использованием предварительного этапа обогащения. По результатам ПЦР-анализа выяснилось, что в образцах с предварительным

обогащением произошло увеличение количества ПЦР продуктов участка хлоропластного гена *Ntpsb* в образце при одновременном уменьшении количества ядерной ДНК по сравнению с контрольным образцом, содержащим тотальную ДНК табака (рис. 2). В среднем было показано увеличение ПЦР-продукта гена *Ntpsb* в 43 раза (рис. 3). И, наоборот, в контрольном образце наблюдалось большее количество ПЦР продуктов уникального ядерного гена *Ntpdr* по сравнению с образцами после обогащения (рис. 1). Содержание ПЦР-продуктов гена *Ntpdr* в контрольном образце было большим в 56 раз по сравнению с геном *Ntpsb* (рис. 3). Эти результаты показывают, что даже при использовании специальной процедуры обогащения, ядерной ДНК в образцах остается достаточно много, что может иметь негативный эффект при полногеномном секвенировании пластома. В связи с этим существует необходимость в двукратном применении метода обогащения в градиенте сахарозы. Можно предполагать, что добиться более высоких результатов можно при двух условиях: во-первых, количество растительного материала должно быть значительным, ведь на каждом этапе будут неизбежны потери материала. Во-вторых, существует необходимость в более качественном выделении интактных хлоропластов.

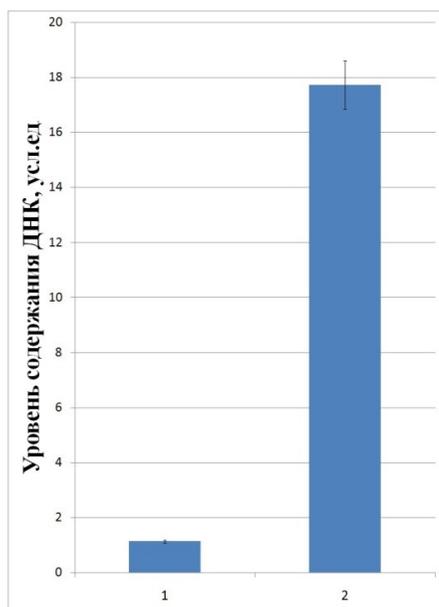


Рис. 1. Относительное содержание гена *Ntpdr* в исследуемых образцах ДНК (в условных единицах): 1 – содержание гена *Ntpdr* в образце с обогащенной фракцией хлоропластов, 2 – содержание гена *Ntpdr* в образце с тотальной ДНК

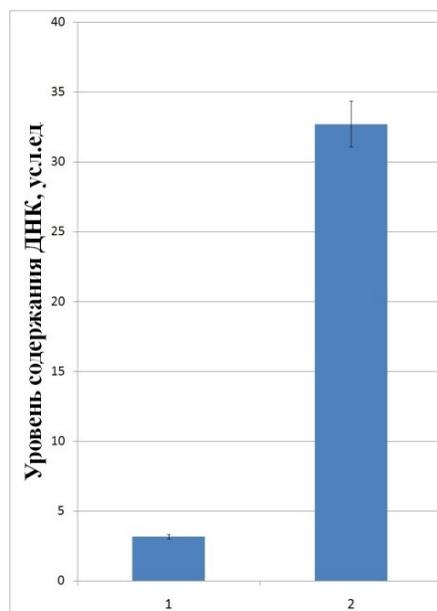


Рис. 2. Относительное содержание гена *Ntpsb* в исследуемых образцах ДНК (в условных единицах): 1 – содержание гена *Ntpsb* в образце с тотальной ДНК, 2 – содержание гена *Ntpsb* в образце с обогащенной фракцией хлоропластов

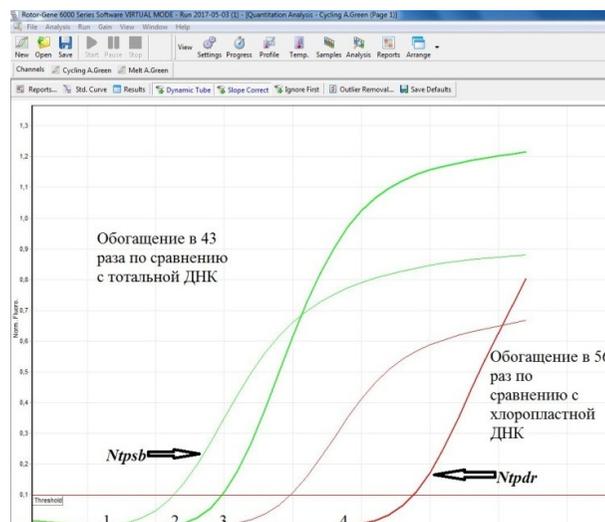


Рис. 3. Кинетические кривые сравнения образцов с тотальной ДНК с образцом с уменьшением содержания ядерной ДНК: 1 – образцы с тотальной ДНК; 2 – образцы с обогащенной хлоропластной ДНК; 3 – образцы с обогащенной хлоропластной ДНК; 4 – образцы с тотальной ДНК

В нашей работе использовались две методики, которые мы впервые применили последовательно друг за другом. Первая [4] нужна была для получения неразрушенных хлоропластов, вторая [5] – для отделения хлоропластов от ядер. Отличие от работы [5] заключалось в том, что

мы для отбора слоя хлоропластов после ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы с целью уменьшения количества ядерной ДНК использовали специальный насос. Можно предполагать, что для увеличения содержания доли хлоропластной ДНК следует использовать сахарозный градиент два раза. То есть раствор, полученный при первом центрифугировании, следует вновь перенести на градиент сахарозы, повторно центрифугировать при 10000 g 45 мин и снова собрать слой неразрушенных хлоропластов в пробирки. Но дальнейшее использование градиента сахарозы более двух раз, вероятнее всего, нецелесообразно, так как не приведет к существенному увеличению числа интактных хлоропластов, а, скорее, даже уменьшит их количество.

Метод, описанный в нашей работе, является объединением двух технологий и дополнением к существующим методикам отделения неразрушенных хлоропластов. Мы полагаем, что оптимизированная нами методика может быть использована при пробоподготовке для полногеномного секвенирования пластовов различных видов растений, таких как диплоидные пшеницы, так же, как и другие известные методы [4–6].

Литература

1. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Формирование полиэмбриоидов в культуре *in vitro* как этап биотехнологии клонирования пшеницы // Известия Уфимского научного центра РАН. 2014. № 1. С. 22–26.
2. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Галин И.Р., Зинатуллина А.Е., Анохина Н.С. Развитие адроклиных растений пшеницы в полевых условиях *in vivo* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 3. С. 26–30.
3. Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Структура генома и хромосомный анализ растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Том 17. № 4/2.
4. Farrar K., Donnison I. Construction and screening of BAC libraries made from *Brachypodium* genomic DNA // Nature Protocols 2. 207. P. 1661–1674.
5. Zhang Y., Iaffaldano B., Zhuang X., Cardina J., Cornish K. Chloroplast genome resources and molecular markers differentiate rubber dandelion species from weedy relatives // BMC Plant Biology. 2017. P. 17–34.
6. Taylor N., Millar H. Isolation of plant organelles and structures: Methods and protocols // Methods in Molecular Biology. 2017. Vol. 1511. P. 1–338.
7. Graham D.E. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses // Anal. Biochem. 1978. Vol. 78. P. 673–678.
8. Sasabe M., Toyoda K., Shiraishi T., Inagaki Y., Ichinose Y. cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: *NtPDR1* is a novel elicitor-responsive gene // FEBS Letters 518. 2002. P. 164–168.
9. Torabi S., Umate P., Manavski N., Plöchinger M., Kleinknecht L., Bogireddi H., Herrmann R.G., Wanner G., Schröder W.P., Meurer J. *PsbN* is required for assembly of the photosystem II reaction center in *Nicotiana tabacum* // The Plant Cell. 2014. Vol. 26. P. 1183–1199.

References

1. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Formation of polyembryoids in *in-vitro* culture as a stage of wheat cloning biotechnology. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2014, no. 1, pp. 22–26.
2. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zaytsev D.Yu., Galin I.R., Zinatullina A.E., Anokhina N.S. Development of wheat androclinal plant under field conditions *in vivo*. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2017, no. 3, pp. 26–30.
3. Badaeva E.D., Salina E.A. Genome structure and plant chromosome analysis. Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii, 2013, vol. 17, no. 4/2.
4. Farrar K., Donnison I. Construction and screening of BAC libraries made from *Brachypodium* genomic DNA. Nature Protocols 2, vol. 207, pp. 1661–1674.
5. Zhang Y., Iaffaldano B., Zhuang X., Cardina J., Cornish K. Chloroplast genome resources and molecular markers differentiate rubber dandelion species from weedy relatives. BMC Plant Biology, 2017, pp. 17–34.
6. Taylor N., Millar H. Isolation of plant organelles and structures: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology, 2017, vol. 1511, pp. 1–338.
7. Graham D.E. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses. Anal. Biochem., 1978, vol. 78, pp. 673–678.
8. Sasabe M., Toyoda K., Shiraishi T., Inagaki Y., Ichinose Y. cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: *NtPDR1* is a novel elicitor-responsive gene. FEBS Letters, 518. 2002, pp. 164–168.
9. Torabi S., Umate P., Manavski N., Plöchinger M., Kleinknecht L., Bogireddi H., Herrmann R.G., Wanner G., Schröder W.P., Meurer J. *PsbN* is required for assembly of the photosystem II reaction center in *Nicotiana tabacum*. The Plant Cell, 2014, vol. 26, pp. 1183–1199.



**ISOLATION OF *NICOTIANA TABACUM* L. GENOMIC DNA ENRICHED
WITH CHLOROPLAST DNA USING SUCROSE GRADIENT**

© **A.R. Kuluev, R.T. Matniyazov, Yu.M. Nikonorov, A.V. Chemeris**

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, RAS,
71, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

For sequencing plant chloroplast genomes it is necessary to develop special DNA isolation methods. Traces of nuclear DNA may lead to erroneous sequencing results. Therefore, new approaches are constantly being developed to enrich total DNA with the fraction of chloroplast DNA and to have control over the purity of the product. The paper describes an improved method of chloroplast DNA isolation using sucrose gradient, which is exemplified by *Nicotiana tabacum* L. as a model object. For this purpose, we extracted intact chloroplasts and nuclei from tobacco leaves. The resultant chloroplasts were purified from nuclei and cellular compartments by sucrose gradient centrifugation. Then we performed preliminary separation of the non-destroyed chloroplast layer using a special pump. To assess the amount of chloroplast DNA relative to total DNA (control) we used primers for unique nuclear and chloroplast genes (available in a single copy). The first pair of primers was selected for the *Ntpdr* unique nuclear gene site that encodes proteins belonging to the family of ATP-binding transporters with pleiotropic drug resistance (PDR). The second pair of primers was selected for the *Ntpsb* unique chloroplast gene site that encodes the major part of proteins in photosystem II. By applying the real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), a nearly 40-fold increase was shown in the amount of chloroplast DNA alongside the simultaneous reduction of nuclear DNA after the enrichment procedure. This improved method of chloroplast DNA isolation is recommended to be used during sample preparation for whole-genome sequencing of plant plastomes.

Key words: chloroplast DNA, plastome, sucrose gradient, quantitative polymerase chain reaction, whole-genome sequencing.