

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### VYUŽITIE DNA BEZ-IZOLAČNÝCH PRÍSTUPOV V ANALÝZACH GENÓMOV RASTLÍN

JANA ŽIAROVSKÁ<sup>a</sup>, ANDREA HRICOVÁ<sup>b</sup>,  
ZDENKA GÁLOVÁ<sup>c</sup>, MICHAL ZÁHORSKÝ<sup>b</sup>  
a DANKA BOŠEJOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, <sup>b</sup> Ústav genetiky a biotechnológií rastlín Slovenskej akadémie vied, Akademická 2, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, <sup>c</sup> Katedra biochémie a biotechnológie, FBP SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra  
jana.ziarovska@uniag.sk

Došlo 26.5.16, prijaté 13.7.16.

Kľúčové slová: DNA bez-izolačné prístupy, priama PCR, iPBS markéry, brečtan, láskavec

#### Úvod

Amplifikácia záujmových fragmentov genómov použitím DNA bez-izolačných prístupov<sup>1–4</sup> umožňuje prípravu PCR priamo z biologických materiálov alebo z len nahrubo pripraveného extraktu bez nutnosti izolácie a purifikácie celkovej genomickej DNA. Vynechanie procesu izolácie DNA prináša benefity v podobe zužitkovania vzorky, keď je k dispozícii len v limitovanom množstve, časovej efektivity a zníženia nákladov na analýzy. DNA bez-izolačné prístupy označované ako priama PCR majú potenciál významne uľahčiť rutinné genotypovanie, aj keď

v prípade rastlín ich aplikácia zatiaľ nie je natoľko rozšírená ako pri živočíšnych tkanivách, čo je spôsobené najmä odlišným obsahom a zložením látok potenciálne kontaminujúcich PCR.

Extrakcia celkovej genomickej DNA je procesom, ktorý slúži k získaniu dostatočného množstva DNA kvalitatívne vyhovujúcej pre najrozmanitejšie aplikácie PCR, klonovania a sekvenovania. Pri práci s rastlinným materiálom je k dispozícii viacero modifikácií základných postupov založených na CTAB či SDS extrakciách, rovnako ako množstvo komerčných extrakčných súprav. Všetky doteraz aplikované postupy izolácie DNA sú založené na kroku mechanického rozrušenia bunkových stien rastlín a následnom postupe chemického naväzovania a postupného odstraňovania jednotlivých zložiek rastlinných buniek mimo DNA<sup>1</sup>.

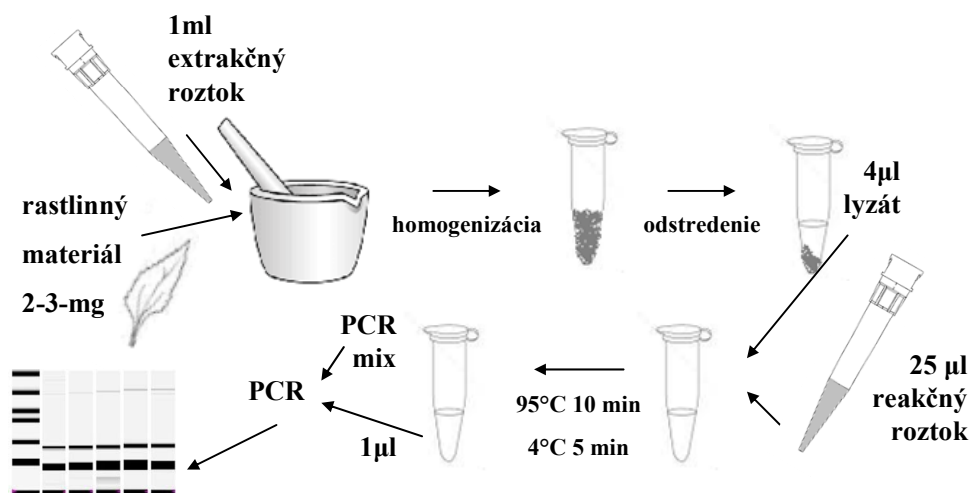
Moderné najmä rekombinantné polymerázy sú dnes už však natoľko robustné, že boli úspešne použité aj pri amplifikáciách z DNA, ktorá sa nachádzala konzervovaná v etanole<sup>2</sup>. Princípom priamej PCR je tak realizácia amplifikácie v prostredí tlmivého roztoku za prítomnosti robustnej modifikovanej polymerázy schopnej realizovať syntézu rastúceho vlákna DNA aj v prostredí najroznejších PCR inhibítorov.

V súčasnosti sa pri postupoch priamej PCR využívajú tri možné platformy<sup>2–4</sup> – amplifikácia z biologického materiálu v prítomnosti špecifického extrakčného tlmivého roztoku, amplifikácia z biologického materiálu v prítomnosti špecifického PCR tlmivého roztoku a amplifikácia priamo z malých výsekov tkaniva či pletiva (tab. I).

Prvý krát bol DNA bez-izolačný prístup pri amplifikácii rastlinnej DNA použitý pri PCR zmnožení *Nit1* génu arábkovky tálovej<sup>3</sup>. Autori použili kombináciu komerčne dostupného extrakčného roztoku a v laboratóriu pripraveného špecifického PCR tlmivého roztoku, pričom výsledkom bola efektívna amplifikácia očakávaného produktu ako v prítomnosti exogénnych, tak aj endogénnych konta-

Tabuľka I  
Porovnanie metodických prístupov v priamej PCR (cit. <sup>2–4</sup>)

Metóda / potrebné činnosti	Príprava pletiva/ tkaniva	Úprava vzorky	PCR
Použitie špecifického extrakčného roztoku	odobranie	inkubácia pri špecifickej teplote a nariedenie/ prípadne lyzácia a zohriatie	štandardný časovo-teplotný režim
Použitie špecifického PCR tlmivého roztoku	odobranie	suspenzácia, lyzácia alebo úprava štiepením (podľa typu)	štandardný časovo-teplotný režim
Použitie výseku pletiva/ tkaniva	vyseknutie priemeru 0,35 / 0,5 mm	nie je potrebná	štandardný časovo-teplotný režim



Obr. 1. Postup realizácie priamej PCR použitím v laboratóriu pripravených roztokov

minantov pochádzajúcich z lyzátu listov arábkovky. Iní autori<sup>4</sup> potvrdili úspešné a efektívne použitie priamej PCR v prípade 32 rôznych čeľadí rastlín v zastúpení angiospermia, gymnospermia a pteridophyta. Popísali extrakčný a reakčný tlmivý roztok pre priamu PCR z rastlinných pletív založený na metóde<sup>5</sup>, ktorá bola úspešne aplikovaná pri amplifikácii virálnej DNA. Ich metóda priamej PCR pozostáva zo systému krokov vedúcich k zostaveniu PCR reakcie ilustrovaných na obr. 1.

Roztoky pre priamu PCR pripravené metodikou<sup>4</sup> boli v PCR plne funkčné ako pre jadrové, tak aj markéry chloroplastovej DNA pri rôznych rastlinných druhoch, napr. *Vitis vinifera* L., *Coffea arabica* L., *Laurus nobilis* L. či *Thymus vulgaris* L. Ako limitujúce faktory úspešnej amplifikácie sú v súčasnosti identifikované nasledovné:

- zloženie extrakčného roztoku, ktoré rozhoduje o dostatočnom uvoľnení DNA z jadra rastlinných buniek,
- prítomnosť protektívnych látok, ktoré v extrakčnom roztoku zabezpečia ochranu pred oxidatívnym a enzymatickým poškodením DNA spôsobeným následným reakčným tlmivým roztokom, ktorý uvoľňuje bielkoviny viazané na DNA,
- charakteristiky použitej polymerázy.

## Experimentálna časť

Ako biologický materiál slúžiaci k testovaniu možnosti DNA bez-izolačného prístupu v amplifikácii multilokusových markérov boli zvolené dva rastlinné druhy – *Amaranthus cruentus* L. a *Hedera helix* L. Pri láskavei boli do reakcií použité listy mladých, v kvetináčoch dopestovaných rastlín a pri brečtane šlo o listy vo fyziologickej zrelosti odoberané v auguste. Analýzy efektivity priamej PCR

v multilokusových markérových technikách boli uskutočnené pomocou iPBS (Inter Primer Binding Site Polymorphism) prajmerov. Celkovo bolo testovaných 18 rozličných iPBS prajmerov so sekvenciami tak, ako sú uvedené autormi<sup>6</sup>. Priama PCR bola uskutočnená komerčne dostupnou sadou Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific) podľa pokynov výrobcu.

V optimalizačných reakciách bol v prvom kroku pre oba druhy testovaný teplotný gradient naväzovania sa iPBS prajmerov a ako optimálna bola empiricky stanovená hodnota 54 °C. Časový a teplotný režim reakcie použitý ku skrínungu všetkých iPBS markérov bol: 95 °C, 3 min; 35 cyklov v nasledovnom profile: 95 °C, 30 s; 54 °C, 40 s; 72 °C, 120 s; finálna polymerizácia 72 °C, 5 min. Úspešnosť amplifikácie bola hodnotená v 1% agarózovom géle a markéry, pri ktorých boli pozitívne identifikované včlenenia príslušných retrotranspozónov, boli následne zhodnotené v 4% PAGE a porovnané k výsledkom získaným pri štandardnej izolácii DNA.

## Výsledky a diskusia

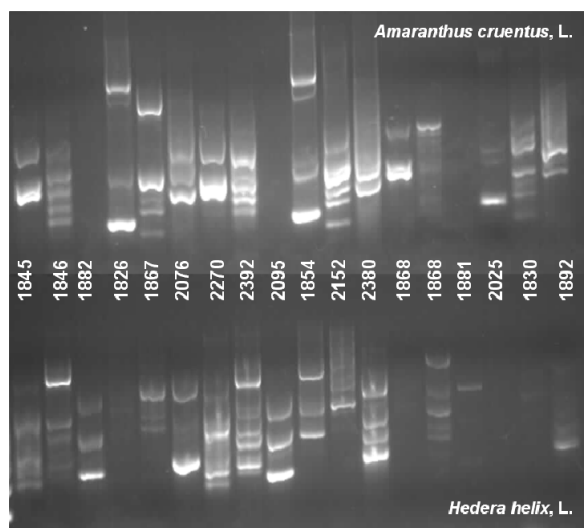
V porovnaní zo živočíšnymi a ľudskými tkanivami<sup>2,7</sup> je priama amplifikácia v prípade rastlín a húb metódou, ktorá sa zatiaľ nevyužíva rutinne, aj keď jej úspešnosť bola potvrdená<sup>3,4,8</sup>. Doterajšie aplikácie DNA bez-izolačného prístupu v PCR analýzach rastlinného genómu boli zamerané na jednofragmentovú amplifikáciu a úspešne boli aplikované ako dilučné, tak aj protokoly vysekávania terčikov z rastlinných pletív<sup>3,4,8,9</sup>, pričom dilučné protokoly sa javia byť spoľahlivejšou metódou v prípadoch, kedy rastlinný materiál predstavuje náročnejšiu vzorku pochádzajúcu z druhov bohatých na obsah PCR interferujúcich zložiek alebo pri amplifikácii GC bohatých

oblastí a autori tento postup považujú za východiskový pri optimalizačných reakciách priamej PCR<sup>9</sup>. Podstata priamej PCR a charakteristiky rekombinantných DNA polymeráz však nevyklučujú použitie tejto metódy aj v prípade amplifikácie multilokusových DNA markérov.

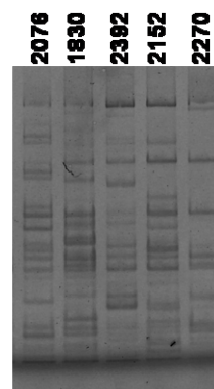
Testované iPBS prajmery boli použité aj k analýzám pracujúcim so štandardne CTAB princípom izolovanou DNA druhu *Hedera helix* L., kde štrnásť z nich poskytlo amplifikačný profil a štyri nie<sup>10</sup>. Výhodou iPBS markérov je, že akonáhle sú pre konkrétny rastlinný druh zo sady univerzálne použiteľných identifikované tie, ktoré poskytujú reprodukovateľný amplifikačný profil a stávajú sa v analýzach genetickej variability efektívnym markérovaním systémom prekonávajúcím viaceré nevýhody starších nešpecifických multilokusových techník ako napríklad polymorfizmus náhodne zmnoženej DNA či dĺžkový polymorfizmus medzi opakovaniami nukleotidov.

Úvodný skrining výsledkov PCR amplifikácie iPBS markérov bol hodnotený v 1% agarózovom géle (obr. 2) a markéry, pri ktorých bola amplifikácia úspešná, boli následne zhodnotené v 4% PAGE (obr. 3).

V prípade oboch testovaných druhov sa priama PCR potvrdila ako prístup, ktorý pri súčasnej robustnosti používaných polymeráz má potenciál stať sa v rutinnom genotypovaní štandardom. Z celkovo 18 testovaných iPBS markérov neprebehla amplifikácia u láskavca pri troch a u brečtanu pri štyroch z testovaných prajmerov. Výsledky úspešnosti amplifikácie iPBS markérov poskytli pre brečtan vhodné výsledky ako v prípade, keď bol ich skrining robený na DNA, ktorá bola izolovaná komerčne dostupným kolónkovým kitom<sup>10</sup>. Ani v prípade štandardnej izolácie nebola zaznamenaná amplifikácia prajmermi



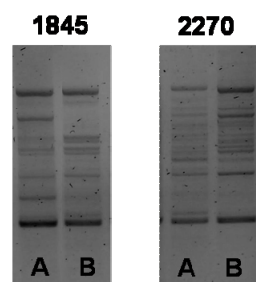
Obr. 2. Úspešnosť amplifikácie iPBS v DNA bez-izolačnom prístupe. Označenie prajmerov číselným kódom podľa cit.<sup>6</sup>



Obr. 3. Elektroforeotické rozdelenie iPBS markérov láskavca v PAGE

1826, 1868, 2025 a 1830. Zobrazenie amplifikácie pre izolačný a bez-izolačný prístup je uvedené na obr. 4.

iPBS markéry analyzujú dĺžkový polymorfizmus medzi miestami naväzovania sa prajmerov retrotranspozónov. Retrotranspozóny sú mobilné elementy prítomné v genómoch mnohých eukaryotických organizmov a hojne zastúpené najmä v rastlinných organizmoch, kde sú často základným komponentom jadrovej DNA a najpočetnejšou skupinou mobilných elementov. Napríklad v kukurici tvoria retrotranspozóny 50–80 % a v pšenici až 90 % genómu<sup>11</sup>. Sekvencie pre naväzovanie sa prajmerov (PBS) sú prítomné vo všetkých LTR (Long Terminal Repeat) retrotranspozónoch. Na tomto základe bola popísaná univerzálne použiteľná metóda<sup>6</sup>, ktorá pracuje s konzervatívnymi časťami PBS sekvencií a uplatňuje sa v priamej vizualizácii dĺžkového polymorfizmu medzi jedincami, analýzach transkripčného profilu ako aj pri klonovaní LTR oblastí z celkovej genomickej DNA. Pri druhu brečtan boli iPBS úspešne amplifikované ako markéry vhodné k analýzám variability genómu<sup>10</sup>.



Obr. 4. Porovnanie amplifikačného profilu pre izolovanú DNA (A) a DNA bez-izolačný prístup (B) pri druhu *Hedera helix* L.

**Záver**

Pri oboch rastlinných druhoch (*Hedera helix* L. a *Amaranthus cruentus* L.) bola pozitívne potvrdená efektívna amplifikácia multilokusových markérovacích systémov výsledkami zodpovedajúcimi tým, ktoré sú dosahované pri tradičnej izolácii celkovej genomickej DNA z rastlín. Priame DNA bez-izolačné prístupy tak majú potenciál byť v budúcnosti využívané k rutinným analýzám a lepšiemu časovému manažmentu laboratórií.

## Použité skratky

CTAB	cetyltrimetyl amónium bromid
iPBS	dĺžkový polymorfizmus medzi miestami nasadenia primera (inter Primer Binding Site Polymorphism)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)
SDS	dodecylsulfát sodný

*Vedecká publikácia vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu „Vybudovanie výskumného centra AgroBioTech“ ITMS 220220180 a projektu VEGA – 02/0041/16 – Molekulárne metódy v šľachtení prirodzene bezlepkového amarantu.*

## LITERATÚRA

1. Verbylaitė R., Breidys P., Rimas V., Kuusienė, S.: *Balt. Forestr* 16, 35 (2010).
2. Shokralla S., Singer G. A. C., Hajibabaei M.: *Bio-Techniques* 48, 1 (2010).
3. Yang Y. G., Kim J. Y., Soh M. S., Kim D. S.: *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 444 (2007).
4. Bellstedt D. U., Pirie M. D., Visser J. C., de Villiers M. J., Gehrke B.: *Am. J. Bot.* 97, 65 (2010).
5. La Notte P., Minafra A., Saldarelli P.: *J. Virol. Methods* 66, 103 (1997).

6. Kalendar R., Klemola A., Smýkal P., Schulman A. H.: *Theor. Appl. Genet.* 121, 1419 (2010).
7. Bu Y., Huang H., Zhou G.: *Anal. Biochem.* 375, 370 (2008).
8. Bent E., Taylor D. L.: *J. Microbiol. Methods* 80, 206 (2010).
9. Chum P. Y., Haines J. D., André C. P., Kuusisto P. K., Kelley M. L.: *J. Vis. Exp.* 67, 3844 (2012).
10. Žiarovská J., Bošeľová D., Zeleňáková L., Bežo M.: *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 5, 23 (2016).
11. Schulman A. H., v knihe: *Plant Transposable Elements, Topics in Current Genetic* (Grandbastien M. A., Casacuberta J. M., ed.), Springer-Verlag, Berlin 2012.

**J. Žiarovská<sup>a</sup>, A. Hricová<sup>b</sup>, Z. Gálová<sup>c</sup>, M. Záhorský<sup>b</sup>, and D. Bošeľová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>Department of Genetics and Plant Breeding, Slovak University of Agriculture in Nitra, <sup>b</sup>Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, <sup>c</sup>Department of biochemistry and biotechnology, Slovak University of Agriculture in Nitra): **Utilization of Direct Amplification Methodology for Plant Genome Analysis**

In this paper, the first description of the application of direct PCR (polymerase chain reaction) on multilocus markers amplification is reported. Two plant species – *Hedera helix*, L. and *Amaranthus cruentus*, L. were used in direct PCR for iPBS (inter Primer Binding Site) markers. For both of them, the amplification was obtained that was not only fully reproducible but also corresponded to the results obtained by the same markers in PCR when the standard DNA extraction method was used. In total, 18 different iPBS markers were tested. Direct PCR can thus be considered to be potentially applicable in the laboratory to all the standard procedures of genotyping and to help to improve time management there.