

В. А. Жуков¹, М. Н. Пovyдыш²

Система праймеров для амплификации диагностического фрагмента интрона хлоропластного гена *trnL* на деградированной ДНК из гербарного материала

V. A. Zhukov, M. N. Povydysh

System of primers for amplification the diagnostic fragment of chloroplast *trnL* gene on degraded DNA from herbarium material

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Пушкин

²Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург
mpovydysh@yandex.ru

В работе предложены последовательности праймеров и условия проведения «вложенной ПЦР» (англ. nested PCR) совместно со стандартными праймерами С и D (Taberlet et al., 1991) для амплификации диагностического фрагмента интрона *trnL* на деградированной ДНК, выделенной из гербарного материала. Успешно амплифицирован и секвенирован фрагмент интрона *trnL* на ДНК *Ormosia ormondii* Merr.

Ключевые слова: гербарный материал, молекулярная филогения, *trnL*, ПЦР.

Гербарные образцы являются уникальным источником материала для изучения биоразнообразия растений. В мире насчитывается более 350 миллионов гербарных образцов, представляющих практически все описанные виды растений (<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>). Развитие современных методов молекулярной биологии позволяет дополнять традиционные исследования морфологических признаков информацией о последовательностях диагностических фрагментов ДНК гербарных образцов. Гербарии, таким образом, представляют собой настоящий «ящик с сокровищами», который, однако, не так просто открыть (Särkinen et al., 2011). ДНК, выделяемая из засушенных гербарных образцов, является сильно деградировавшей (фрагментированной) (Doyle, Dickson, 1987; Staats et al., 2011), что негативно влияет на эффективность амплификации диагностических фрагментов в ходе реакции ПЦР. Кроме того, препараты выделяемой ДНК могут содержать следы различных фунгицидов и инсектицидов, используемых для повышения сохранности гербария и также ингибирующих ПЦР.

Принцип идентификации таксона на основании последовательности диагностического фрагмента ДНК широко используется в молекулярно-филогенетических, эволюционных и экологических исследованиях (Valentini et al., 2009). В качестве диагностического фрагмента для растений часто применяется последовательность интрона хлоропластного гена *trnL*, кодирующего транспортную РНК лейцина (Taberlet et al., 1991,

2007). Интрон *trnL* весьма вариабелен на уровне родов и достаточно консервативен на внутривидовом уровне; в то же время, он фланкирован консервативными последовательностями, к которым возможно подобрать праймеры, универсальные для растений, относящихся к различным отделам (мхи, папоротники, голосеменные, покрытосеменные). У разных таксонов высших растений размер данного интрона составляет от 254 до 767 пар нуклеотидов, что делает этот участок удобным для амплификации и секвенирования (Taberlet et al., 1991, 2007).

Универсальные праймеры для амплификации интрона *trnL* были предложены более 20 лет назад (Taberlet et al., 1991). К настоящему моменту они были использованы для амплификации диагностического фрагмента интрона *trnL* с последующим секвенированием для сотен и тысяч видов высших растений. По данным P. Taberlet с соавторами, к 2007 году в базе данных NCBI насчитывалось более 18 000 последовательностей интрона *trnL*, а сейчас их число превышает 30 000. Однако из-за значительного размера ампликона использование этих праймеров на гербарной ДНК часто неэффективно (по данным Sarkinen с соавт. (2011), только у 10 % образцов амплифицируется протяженный фрагмент хлоропластной ДНК *rbcl* размером более 600 п. н.), и поэтому рекомендуется использовать для анализа другие диагностические фрагменты, размером менее 300 п. н. Более короткие фрагменты, в свою очередь, не обеспечивают требуемого разрешения для разделения родов и видов при молекулярно-филогенетическом анализе.

В рамках работы по реконструкции филогенетических взаимоотношений базальных таксонов подсемейства мотыльковых (*Fabaceae*, *Papilionoideae*) возникла необходимость в амплификации и секвенировании интрона *trnL* для ряда видов. На ДНК, выделенной из имеющегося гербарного материала (сильно деградированной), не удавалось амплифицировать фрагмент *trnL* с использованием стандартных универсальных праймеров. Для решения проблемы была предложена система праймеров для «вложенной ПЦР» (англ. nested

PCR), позволяющая амплифицировать фрагменты интрона *trnL* на деградированной ДНК, пригодные для секвенирования.

Гербарные образцы для выделения ДНК были отобраны во время визита в Royal Botanic Gardens, Kew. Отбирали неповрежденные листья с гербарных экземпляров, собранных в период с 1987 по 2004 г. Аликвоты ДНК были любезно предоставлены Mr. Felix Forest (Jodrell Laboratory, Molecular Systematic Section, Royal Botanic Gardens, Kew). При выделении ДНК использовался модифицированный СТАВ-метод (Doyle, Doyle, 1987).

Вид *Ormosia ormondii* Merr. является единственным представителем рода, произрастающим на территории Австралии, поэтому представляется важным определить степень его родства с остальными видами *Ormosia* и целесообразность его отнесения к этому роду. Единственный доступный гербарный образец этого вида, использованный в нашей работе, датирован 1981 г. (11385. Australia. Nyland. 07.12.1981).

Концентрацию ДНК, выделенной из гербарного образца, а также ее качество оценивали на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония).

Последовательности диагностических фрагментов интрона *trnL* различных видов и родов бобовых растений, на основании которых был проведен дизайн праймеров, взяты из базы NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Их номера в базе данных NCBI приведены в табл. 1. Для выравнивания последовательностей использована программа Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Таблица 1

Последовательности хлоропластного гена *trnL*, использованные для дизайна праймеров

Вид	Идентификационный номер в базе NCBI	Примечание
<i>Cicer arietinum</i> L.	EU835853.1	полный хлоропластный геном
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	JX512022.1	полный хлоропластный геном
<i>Pisum sativum</i> L.	HM029370.1	полный хлоропластный геном
<i>Clathrotropis nitida</i> (Benth.) Harms	JX124468.1	фрагмент гена <i>trnL</i>
<i>Ormosia excelsa</i> Benth.	JX275914.1	фрагмент гена <i>trnL</i>
<i>Ormosia</i> sp.	AF309483.1	фрагмент гена <i>trnL</i>
<i>Ormosia</i> sp.	AF309485.1	фрагмент гена <i>trnL</i>
<i>Sophora flavescens</i> Aiton	JN102178.1	фрагмент гена <i>trnL</i>

Последовательности стандартных универсальных праймеров, использованных для амплификации диагностического фрагмента интрона *trnL*, а также праймеров, сконструированных в настоящей работе, приведены в табл. 2.

Для проведения ПЦР использовали набор реактивов Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия), содержащий смесь высокоточных термостабильных полиме-

раз. ПЦР проводили в амплификаторе Bio-Rad C1000 (Bio-Rad, США).

Таблица 2

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность, 5'-3'	Источник
C	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al., 1991
D	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet et al., 1991
<i>trnL_fw1</i>	AATTGGATTGAGCCTTGGTATGG	настоящая работа
<i>trnL_rv1</i>	GACTTGAACCCTCACGATTTC	настоящая работа

Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов проводили после очистки с помощью смеси *EcoI* (экзонуклеаза I) и SAP (shrimp alkaline phosphatase — щелочная фосфатаза креветки) (Fermentas, Литва). ПЦР-продукт (2–8 мкл) с добавлением 10 U *EcoI* (Thermo Scientific, США), 10 U SAP (Fermentas, Литва), 1 мкл 10× SAP-буфера (Fermentas, Литва) инкубировали при 37 °C в течение 30 минут, затем при 65 °C в течение 10 минут в объеме 10 мкл.

Количество ДНК в препарате из гербарного материала, определенное на основании абсорбции при длине волны 260 нм (A_{260}), было приемлемым для проведения ПЦР (см. табл. 3). Качество препарата, определенное по отношению значений абсорбции (A_{260}/A_{280}), оказалось весьма низким (табл. 3). ДНК в препарате сильно фрагментирована и представлена в основном короткими фрагментами (100–200 п. н.), что видно на электрофореграмме (рис. 1). Фрагментированность ДНК и недостаточная чистота препарата препятствовали успешному проведению ПЦР со стандартными универсальными праймерами С и D (рис. 1).

Таблица 3

Результаты анализа количества и качества ДНК, выделенной из гербарного образца *Ormosia ormondii* Merr.

A1 (260)	A2 (280)	A1 / A2	Концентрация, нг/мкл
0.0793	0.0630	1.296	357.67

Была предложена схема проведения «вложенной ПЦР», при которой в первом раунде ПЦР проводится амплификация с праймерами С и D, а затем на полученном материале проводится второй раунд ПЦР с праймерами, расположенными ближе к середине целевого фрагмента. Для подбора подходящих внутренних праймеров было проведено выравнивание фрагментов хлоропластного гена *trnL*, соответствующего различным видам и родам бобовых растений (табл. 1). Праймеры были подобраны к консервативным участкам последовательности, ограниченной праймерами С и D (рис. 2).

Были оптимизированы условия проведения ПЦР, в частности, варьировали температуру отжига праймеров, длительность отжига праймеров и синтеза ДНК, а также число циклов ПЦР. Для минимизации ошибок

- Särkinen T., Staats M., Richardson J. E., Cowan R. S., Bakker F. T.* How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens // PLoS ONE. 2012. Vol. 7(8). Art. e43808. DOI: 10.1371/journal.pone.0043808.
- Staats M., Cuenca A., Richardson J. E., Vrieland-van Ginkel R., Petersen G. et al.* DNA damage in plant herbarium tissue // PLoS ONE. 2011. Vol. 6(12). Art. e28448. DOI: 10.1371/journal.pone.0028448.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermet T., Corthier G., Brochmann C., Willerslev E.* Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding // Nucl. Acids Res. 2007. Vol. 35, № 3. Art. e14. DOI: 10.1093/nar/gk1938.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Pl. Molec. Biol. 1991. Vol. 17, № 5. P. 1105–1109.
- Valentini A., Pompanon F., Taberlet P.* DNA barcoding for ecologist // Trends Ecol. Evol. 2009. Vol. 9. P. 51–60.