

ГЕНЕТИКА

УДК 575.17:575.113.2:633.34

doi: 10.25128/2078-2357.23.1–2.5

¹А. О. БАКУМА, ²Т. Г. АЛЕКСЄЄВА, ²Ф. П. ТКАЧЕНКО

¹Державна установа «Інститут морської біології НАН України»
вул. Пушкінська, 37, Одеса, 65048

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082
e-mail: bakumaalla@gmail.com

ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ МЕТОДІВ ЕКСТРАКЦІЇ ДНК, ПРИДАТНОЇ ДЛЯ ПЛР ІЗ ГЕРБАРНИХ ЗРАЗКІВ ВОДРОСТЕЙ РОДУ *CLADOPHORA* KÜTZ.

Екстракція ДНК із водоростей має свої особливості, оскільки вони містять різні полісахариди та поліфеноли, які є інгібіторами ПЛР. Це вимагає оптимізації методу екстракції ДНК для різних груп водоростей. Зокрема, види роду *Cladophora* мають високу морфологічну мінливість, що залежить від умов навколишнього середовища та періоду розвитку водоростей. Застосування молекулярно-генетичного аналізу може допомогти у вирішенні таксономічних та філогенетичних питань цього роду зелених водоростей. У зв'язку з цим, метою роботи було підібрати методу екстракції ДНК із гербарних зразків водоростей видів роду *Cladophora* та апробувати виділену ДНК у ПЛР.

У дослідженні порівнювали два методи екстракції ДНК із наборами реактивів SureFood PREP Basic компанії R-Biopharm та Quick DNA Mini Prep компанії Zymo Research. ДНК перевіряли у ПЛР з використанням універсального праймера іPBS 2080 із застосуванням різних реакційних сумішей, що містять Dream-Taq-полімерази та Sso7d ДНК-полімерази.

У ході експерименту встановлено, що концентрації ДНК і співвідношення A260/A280 та A260/A230, отримані із зразків, екстрагованих набором SureFood PREP Basic, були значно кращими, проте використання їх у ПЛР не дало позитивного результату, імовірно, через наявність значної кількості інгібіторів. ДНК, екстрагована набором Quick DNA Mini Prep за співвідношеннями A260/A280 та A260/A230, значно поступалася, але, очевидно, містила меншу кількість інгібіторів ДНК-полімерази. Це дозволило отримати чіткі фрагменти ампліфікації в ПЛР з праймером іPBS 2080, проте у варіанті із застосуванням високоефективної із підвищеною стійкістю до інгібіторів полімерази Sso7d.

Ключові слова: *Cladophora*, екстракція ДНК, ПЛР, молекулярні маркери, молекулярно-генетичний аналіз, поліморфізм.

Гербарій є документом у Літописі природи. Періодично до нього звертаються для уточнення видів рослин як за морфологічними ознаками, так і в дослідженнях молекулярної еволюції та біорізноманіття. Залежно від віку рослинних зразків та умов їх зберігання ДНК починає деградувати, що ускладнює можливість використання певних екземплярів для молекулярних досліджень [1]. На рівень деградації ДНК у гербарних зразках впливають методи засушення, умови зберігання та обробки від шкідників [17, 18]. Крім цього, успішність виділення ДНК може залежати від стану рослини, наявності відмерлих тканин ще на етапі збирання [15].

Екстракція ДНК із водоростей має свої особливості, оскільки різні таксони продукують різноманітні інгібуючі речовини, що вимагає оптимізації методу екстракції ДНК для різних груп. Поряд із ДНК, у водоростей екстрагуються такі речовини як полісахариди та поліфеноли, які є інгібіторами *Taq*-полімерази [7, 8]. Водорості мають складну структуру клітинної стінки, до якої входять різноманітні полісахариди, зокрема целюлоза, ламінарини, фукани, альгінати, що ускладнюють етапи лізису клітин. Тому багато розроблених методик є або дороговартісними через використання гомогенізації в рідкому азоті, центрифугування в градієнті хлориду цезію, використання β -глюкуронідази, β -глюканази, ксиланази (які розщеплюють специфічні полісахариди клітинної стінки), або можуть застосовуватися для невеликої групи видів [9, 14]. В універсальній методиці, розробленій для таксонів *Chlorophyta*, *Rhodophyta* та *Phaeophyceae*, для преципітації та очистки від поліфенолів використовують лізуючий буфер, що містить PVP та β -меркаптоетанол [14], також рекомендують проводити лізис при кімнатній температурі для зниження кількості полісахаридів [12].

Зелені водорості роду *Cladophora* мають широке географічне поширення: у морях, естуаріях та прісноводних водоймах від помірних до тропічних регіонів, у тому числі на території України. Вони характеризуються високою морфологічною пластичністю, що залежить від умов навколишнього середовища та стадії розвитку водоростей, тому застосування молекулярно-генетичного аналізу може допомогти вирішити таксономічні та філогенетичні питання [4, 11]. Нині відомо про ряд філогенетичних досліджень, що базуються на аналізі послідовностей рибосомальних генів для видів *Cladophora vagabunda* (L. Høek) та *Cladophora albida* (Nees) Kütz. (*Cladophorales*), а також видів із порядку *Siphonocladales* [3, 5, 11]. Подібних досліджень видів роду *Cladophora*, поширених в Україні, ще не проводили.

У зв'язку з цим, метою дослідження було підібрати методику екстракції ДНК із гербарних зразків водоростей роду *Cladophora*, придатної для використання у ПЛР.

Матеріали та методи досліджень

Матеріали для дослідження були взяті із гербарію Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (MSUD). В експерименті використано чотири види зелених водоростей роду *Cladophora*: *Cladophora albida* та *Cladophora laetevirens* (Dillw.) Kütz., (з Одеської затоки Чорного моря), *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (із Дніпро-Бузького лиману біля м. Очаків), *Cladophora sericea* (Huds.) Kütz. (із Тилігульського лиману). Для виділення ДНК використовували два набори із колонками: SureFood PREP Basic R-Biopharm (Німеччина) та Quick DNA Mini Prep компанії Зумо Research (США). ДНК екстрагували із 50 мг сухої слани водоростей для кожного методу. Концентрації ДНК вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 компанії Thermo Scientific відповідно до рекомендацій Thermo Fisher Scientific V1.0 Manual (2009). Щоб перевірити придатність виділеної ДНК для використання у ПЛР, використовували праймер iPBS2080 (послідовність CAGACGGCGCCA), розроблений до LTR-ретротранспозонів [10].

ПЛР проводили із використанням двох різних реакційних сумішей. У першій суміші застосовували реактиви компанії Thermo Scientific загальним об'ємом 10 мкл, яка складалася з 1 мкл 10xDreamTaq Buffer, 1 мкл суміші 25mM dNTPs, 1 мкл праймера (концентрацією 10 пмоль/мкл), 0,05 мкл DreamTaq ДНК полімерази (5 од./мкл), 5,95 мкл води. Протокол ампліфікації: денатурація 3 хв 95°C, 35 циклів – 15 с 95°C, відпал 1 хв 52°C, елонгація 1 хв 72°C та заключна елонгація 10 хв 72°C.

Для іншої суміші використовували реактиви від BioRad: 5 мкл SsoAdvanced Universal Syber GREEN Supermix, 1 мкл праймера (концентрацією 10 пмоль/мкл), 3 мкл води на 10 мкл загального об'єму. Протокол ампліфікації змінювали відповідно до інструкцій рекомендованих для SsoAdvanced Universal Syber GREEN Supermix: денатурація 3 хв 98°C, 35 циклів – 15 с 95°C, відпал 1 хв 56°C, елонгація 1 хв 60°C. Продукти ампліфікації виявляли у 7 % поліакриламідному гелі та фарбували аргентум II нітратом [13].

Результати досліджень та обговорення

Для виділення ДНК із гербарних зразків водоростей було обрано два набори реактивів із колонками. Набір SureFood PREP Basic призначений для екстракції ДНК зразків тварин та

рослин як з цілісних організмів, так і з їхніх фрагментів після технологічної переробки, наприклад у їжі та кормах. Такий підхід може бути прийнятним для деградованої ДНК, яка також може бути присутня в гербарних зразках, які зберігалися тривалий час. Набір Quick DNA Mini Prep – універсальний набір із колонками, запропонований для екстракції ДНК з різних зразків, було обрано тому, що протокол екстракції передбачає етап лізису за кімнатної температури та в лізуючий буфер додається β-меркаптоетанол, що рекомендовано для водоростей [12, 14].

Середня концентрація ДНК водоростей, отримана із застосуванням набору SureFood PREP Basic, становила 131,9 нг/мкл, що є достатнім для постановки ПЛР (табл.). Співвідношення поглинання за довжини хвилі 260 нм і 280 нм (A260/A280) та 260 нм і 230 нм (A260/A230), яке дозволяє оцінити загальний рівень очистки ДНК, становило 2,00 – для A260/A280 та 1,27 – для A260/A230, при нормі для чистої ДНК 1,80–2,00 та 1,8–2,2, відповідно. Найнижча концентрація – 27,1 нг/мкл – була отримана для зразка *Cl. sericea*, найвища – 273,1 нг/мкл – для *Cl. laetevirens*. Як було зазначено Staats et al. [17], на концентрацію можуть впливати такі чинники: кількість зразка, взятого для виділення ДНК, умови його зберігання, а також ефективність лізису клітин.

Таблиця

Концентрації ДНК різних видів роду *Cladophora*, виділеної із гербарних зразків двома різними наборами

Назва зразка	Концентрація	A260/A280	A260/A230
SureFood PREP Basic			
<i>Cl. albida</i>	71,9	2.01	1.09
<i>Cl. laetevirens</i>	273,1	2.03	1.79
<i>Cl. glomerata</i>	155,5	2.03	1.56
<i>Cl. sericea</i>	27,1	1.91	0.63
Середнє значення	131,9	2.00	1,27
Quick DNA Mini Prep			
<i>Cl. albida</i>	9,8	1.33	0.33
<i>Cl. laetevirens</i>	7,1	1.37	0.31
<i>Cl. glomerata</i>	7,4	1.53	0.35
<i>Cl. sericea</i>	3,6	1.47	0.22
Середнє значення	6,9	1.43	0.30

У той час концентрації ДНК, екстрагованої набором Quick DNA Mini Prep, були майже у 20 разів нижчими і становили від 3,6 нг/мкл (*Cl. sericea*) до 9,8 нг/мкл (*Cl. albida*), середнє значення 6,9 нг/мкл (табл.). Показники очистки були значно нижчі від норми як для A260/A280 (1,43), так і для A260/A230 (0,30), що свідчить про наявність інгібіторів білкової, полісахаридної чи поліфенольної природи [19].

Отже, із отриманих концентрацій ДНК та показників очистки A260/A280 та A260/A230 видно, що значно кращий результат як за загальною очисткою, так і за виходом ДНК був отриманий із застосуванням набору SureFood PREP Basic. Проте, за цими даними неможливо установити природу контамінації (білки, поліфеноли чи полісахариди), а також ефективність виділеної ДНК у ПЛР.

Для оцінки придатності виділеної ДНК для молекулярно-генетичного аналізу була проведена ПЛР із використанням праймера iPBS 2080, який розроблений до послідовності довгих термінальних повторів ретротранспозонів, що присутні у всіх еукаріот [10]. Тому цей праймер є універсальним для різних видів та успішно застосовувався як для вищих рослин, так і для тварин та грибів [2, 6, 10]. У якості контрольних зразків використовували рослинну та тваринну ДНК видів *Triticum spelta* L. та *Atherina boyeri*.

ПЛР проводили із двома різними реакційними сумішами з різними типами ДНК-полімерази. Перша суміш містила універсальну *Dream-Taq*-полімерази, із якою взагалі не вдалося отримати фрагменти ампліфікації із ДНК кладофори, екстрагованої двома методами (рис. А), причому контрольна ДНК спрацювала у реакції.

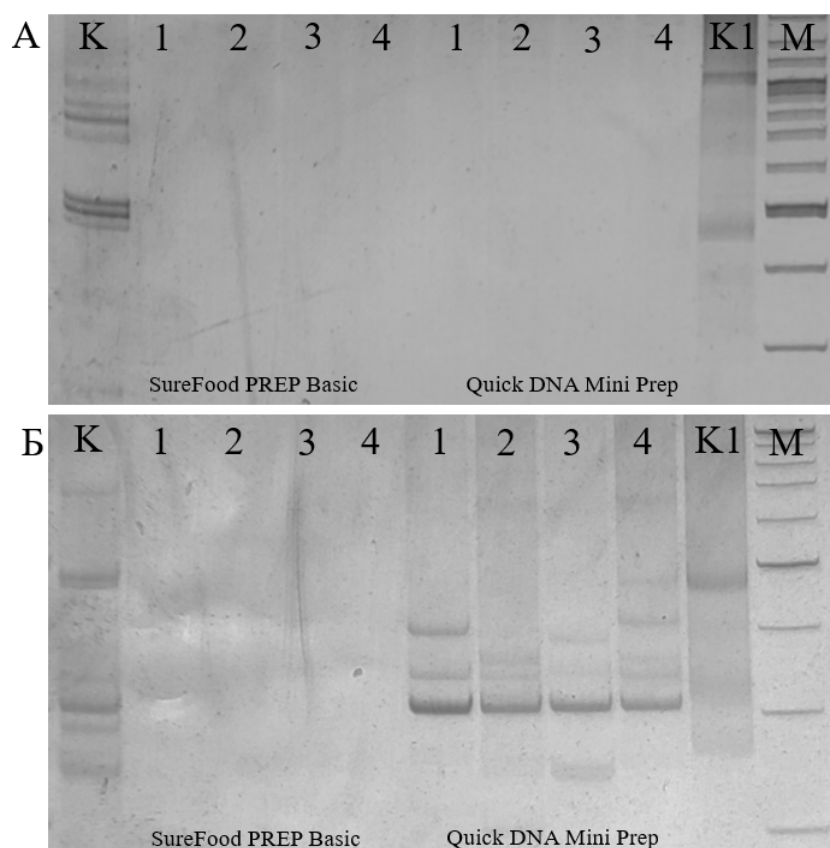


Рисунок. Електрофореграма продуктів ПЛР з праймером іPBS 2080 із ДНК водоростей, виділених різними методами та з використанням різних реакційних сумішей: із DreamTaq ДНК полімеразою (А) та Sso7d ДНК полімеразою (Б). Зразки ДНК: 1 – *Cl. albida*; 2 – *Cl. laetevirens*; 3 – *Cl. glomerata*; 4 – *Cl. sericea*; К – *Atherina boyeri*; K1 – *Triticum spelta* L.

В іншій реакційній суміші використовували SsoAdvanced Universal Syber GREEN Supermix, що містить Hot-Start ДНК-полімеразу Sso7d, яка характеризується підвищеною стійкістю до інгібіторів [16]. Із цією реакційною сумішшю позитивний результат ПЛР було отримано для всіх чотирьох видів *Cladophora*, які були екстраговані набором Quick DNA Mini Prep (рис. Б). Крім цього, між різними видами кладофор було виявлено поліморфізм: окрім одного спільного для всіх фрагмента ампліфікації, розміром 310 п.н., кожен вид відрізнявся наявністю одного-двох відмінних фрагментів ампліфікації: *Cl. albida* – 340 п.н. та 395 п.н., *Cl. laetevirens* – 340 п.н. та 355 п.н., *Cl. glomerata* – 345 п.н. та 385 п.н., *Cl. sericea* – 340 п.н., 355 п.н., 408 п.н. та 490 п.н. Наявність поліморфізму може бути цікавою для подальших досліджень.

Висновки

Отже, незважаючи на те, що концентрації ДНК та показники очистки, отримані у зразків, екстрагованих набором SureFood PREP Basic, були значно кращими, використання їх у ПЛР не дало позитивного результату, ймовірно, через наявність інгібіторів.

ДНК, екстрагована набором Quick DNA Mini Prep, за показниками очистки значно поступалася попередньому варіанту, але, очевидно, вона містила меншу кількість інгібіторів ДНК-полімерази, що дозволило отримати чіткі фрагменти ампліфікації в ПЛР з праймером іPBS 2080, але із застосуванням лише високоефективної, полімерази Sso7d із підвищеною стійкістю до інгібіторів.

1. Andreasen K., Manktelow M., Razafimandimbison S.G. Successful DNA amplification of a more than 200-year-old herbarium specimen: recovering genetic material from the Linnaean era. *Taxon*. 2009. № 3 (58). P. 959–962. doi: 10.1002/tax.583023.
2. Aydın F., Özer G., Alkan M., Çakır I. The utility of iPBS retrotransposons markers to analyze genetic variation in yeast. *Intern. J. Food Microbiol.* 2020. № 325. P. 108647. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108647.
3. Bakker F. T., Olsen J. L., Stam W. T., Hoek C. Van Den. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albida* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 1992. № 28. P. 839–845.
4. Dodds W. K., Gauder D. A. The ecology of *Cladophora*. *J. Phycol.* 1992. № 28. P. 415–427. DOI:10.1111/j.0022-3646.1992.00415.x.
5. Gestinari L. M., Oliveira M., Milstein D., Yoneshigue-Valentin Y., Pereira S. Phylogenetic analyses of *Cladophora vagabunda* (L.) C. Hoek (Cladophorales, Chlorophyta) from Brazil based on SSU rDNA sequences. *Acta Botanica Brasilica*. 2009. № 32. P. 531–538.
6. Haliloğlu K., Türkoğlu A., Öztürk H. I., Özkan G., Elkoca E., Poczai P. iPBS-retrotransposon markers in the analysis of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm. *Türkiye. Genes (Basel)*. 2022. № 13 (7). P. 1147. doi: 10.3390/genes13071147.
7. Hoarau G., Coyer J., Stam W. T., Olsen J. L. 2007. A fast and inexpensive DNA extraction/purification protocol for brown macroalgae: technical article. *Mol Ecol Notes*. 7:191–193. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01587.x.
8. Jin H. J., Kim J. H., Sohn C. H., DeWreede R. E., Choi T. J., Towers G. H. N., Hudson J. B., Hong Y. Inhibition of Taq DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. *J Appl Phycol*. 1997. № 9. P. 383–388. doi: 10.1023/A:1007925202219.
9. Joubert Y., Fleurence J. DNA isolation protocol for seaweeds. *Plant Mol Biol Rep*. 2005. № 23. P. 197. doi: 10.1007/BF02772712.
10. Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Shulman A. H. 2010. IPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. № 121 (8). P. 1419–1430. DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2.
11. Leliaert F., Rousseau F., Reviere B., Coppejans E. Phylogeny of the *Cladophorophyceae* (Chlorophyta) inferred from partial *LSU* rRNA gene sequences: is the recognition of a separate order Siphonocladales. *European Journal of Phycology*. 2003. № 38 (3). P. 233–246. DOI:10.1080/1364253031000136376.
12. Murray M. G. Thompson W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nuc. Acids Res*. 1980. № 8. P. 4321–4325. doi:10.1093/nar/8.19.4321.
13. Promega Technical Manual. USA : Gene Print. STR Systems, 1999. 52 p.
14. Ramakrishnan G. S., Fathima A. A., Ramya M. A rapid and efficient DNA extraction method suitable for marine macroalgae. *3 Biotech*. 2017. № 7 (6). P. 364. doi: 10.1007/s13205-017-0992-2.
15. Sakharova V. H., Blume R. Ya., Rabokon A. N., Pirkov Ya. V., Mosyakin S. L., Blume Ya. B. Comparison of methods of dna extraction from herbarium specimens of littlepod false flax (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.). *Fact. Exp. Evol. Org.* 2022. № 30. P. 30–36. URL: <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v30.1457> (Last accessed: 18.05.2023)
16. SsoAdvanced Universal Cyber GREEN Supermix Instruction manual. Bio-Rad Laboratories. USA, 2013. 27 p.
17. Staats M., Cuenca A., Richardson J. E., Vrieling-van Ginkel R., Petersen G., Seberg O., Bakker F.T. DNA damage in plant herbarium tissue. *PLoS One*. 2011. № 6 (12). P. e28448. doi: 10.1371/journal.pone.0028448.
18. Telle S., Thines M. Amplification of *cox2* (~ 620 bp) from 2 mg of up to 129 years old herbarium specimens, comparing 19 extraction methods and 15 polymerases. *PLoS One*. 2008. № 10 (3). P. e3584. doi: 10.1371/journal.pone.0003584.
19. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer, V1.0 user manual, 2009. 97 p.

¹A. O. Bakuma, ²T. G. Aliksieieva, ²F. P. Tkachenko

¹Institute of Marine Biology of the NAS of Ukraine, Ukraine

²Odesa I. I. Mechnikov National University, Ukraine

EFFICIENCY OF DIFFERENT METHODS OF EXTRACTION OF DNA SUITABLE FOR PCR FROM HERBAL SPECIMENS OF ALGAE GENUS *CLADOPHORA* KÜTZ.

DNA extraction from algae presents unique challenges due to the production of various polysaccharides and polyphenols, which can act as PCR inhibitors. Consequently, optimizing DNA

extraction methods becomes necessary for different groups of algae. The *Cladophora* genus, known for its high morphological variability influenced by environmental conditions and developmental stages, can benefit from molecular genetic analysis in addressing taxonomic and phylogenetic inquiries within the green algae family.

In this context, the primary objective of this study was to select an appropriate DNA extraction method for herbarium specimens of *Cladophora* algae and evaluate the extracted DNA's suitability for PCR. The study compared two DNA extraction methods, namely the SureFood PREP Basic kit from R-Biopharm and the Quick DNA Mini Prep kit from Zymo Research. Subsequently, the isolated DNA was subjected to PCR using the universal primer iPBS 2080 with different reaction mixtures containing Dream-Taq polymerase and Sso7d DNA polymerase.

The results revealed that the DNA concentrations and purification rates obtained from samples extracted using the SureFood PREP Basic kit were notably superior. However, PCR using these DNA samples did not yield positive results, likely due to the presence of inhibitors. On the other hand, DNA extracted using the Quick DNA Mini Prep kit exhibited lower purification rates but likely contained fewer DNA polymerase inhibitors. This allowed for successful amplification with the iPBS 2080 primer, utilizing the high-efficiency Sso7d polymerase, known for its resistance to inhibitors.

Key words: Cladophora, DNA extraction, PCR, molecular markers, molecular-genetic analysis, polymorphism.

Надійшла 30.05.2023.

УДК 575.224

doi: 10.25128/2078-2357.23.1–2.6

¹М. А. КРИЖАНОВСЬКА, ¹О. Ю. МАЙОРОВА, ²Н. Я. ГОЛУБ

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005
e-mail: kryganovska@chem-bio.com.ua

АНАЛІЗ ДИНАМІКИ НАРОДЖЕННЯ ДІТЕЙ З АУТОСОМНИМИ ТРИСОМІЯМИ ПО ХМЕЛЬНИЦЬКІЙ ОБЛАСТІ

Стаття присвячена динаміці народження дітей з трисоміями за 21, 18 та 13 парю аутосом у Хмельницькій області протягом 2017–2021 років. Проведений аналіз показав, що за п'ять років в області народилося 50475 немовлят. Проте щороку спостерігалось зниження народжуваності у середньому на 705 дітей, а частота новонароджених із синдромом Дауна, Едвардса і Патау коливалася у межах 0,10–0,13 %. За досліджуваний період народилося 45 дітей з синдромом Дауна, у яких згідно із цитологічними обстеженнями виявлено повну трисомію (39 дітей, 87 %), мозаїчну форму (4 дитини, 9 %), транслокаційну форму (2 дитини, 4 %); 12 дітей із синдромом Едвардса, у яких діагностували повну трисомію (9 дітей, 67 %) та мозаїчну форму (3 дитини, 33 %); 2 дітей із синдромом Патау, що мали повну трисомію. Проаналізувавши амбулаторні дані хворих пацієнтів щодо розподілу батьків пробандів за віком, встановлено, що основна частина (38 породіль, 64 %) припадає на батьків, які не відносяться до групи ризику за віком щодо народження дитини із трисомією.

Ключові слова: аутосомні трисомії, коливання народжуваності немовлят, синдром Едвардса, синдром Дауна, синдром Патау.

Здоров'я населення займає одне з перших місць у системі життєвих цінностей будь-якої держави і є невід'ємною умовою гармонійного розвитку людей і суспільства. У будь-якій країні світу народження дитини – найщасливіша подія у родині, але народження здорової