

Оглавление

Предисловие	5
I. РАСШИФРОВКА ЧЕРТЕЖА ЖИЗНИ: МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ДНК РАСТЕНИЙ	7
1. Обзор структуры и функции ДНК у растений	7
2. Методы выделения ДНК	10
Лабораторная работа № 1. Выделение ДНК методом СТАБ.....	11
Лабораторная работа № 2. Выделение ДНК методом SDS	13
3. Количественное определение и оценка качества ДНК.....	14
Лабораторная работа № 3. Электрофорез в 1 % агарозном геле и ТАЕ-буфере	15
Лабораторная работа № 4. Количественное определение и оценка качества ДНК с помощью спектрофотометрии.....	17
4. Методы анализа ДНК	18
Лабораторная работа № 5. Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ITS-праймерами	27
II. ТРАНСКРИПЦИЯ ЖИЗНИ: ВЫДЕЛЕНИЕ РНК И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ	28
1. Введение в РНК в растениях	28
2. Методы выделения РНК.....	29
Лабораторная работа № 6. Выделение РНК с использованием фенол-хлороформа	31
Лабораторная работа № 7. Протокол выделения РНК с помощью реактива TRIzol.....	32
3. Количественное определение и оценка качества РНК.....	34
Лабораторная работа № 8. Измерение концентрации РНК спектрофотометрически при A260/280	34
Лабораторная работа № 9. Анализ РНК растений методом горизонтального электрофореза в агарозе	35
Лабораторная работа № 10. Проведение обратной транскрипции для получения кДНК	36
Лабораторная работа № 11. Проведение Real-Time PCR для тестируемого гена	37
III. БЕЛКИ В ДЕЙСТВИИ: ВЫДЕЛЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ	39
1. Растительные белки: структурные особенности и последствия для сельского хозяйства	39
2. Методы экстракции белков растений.....	40
Лабораторная работа № 16. Препаративное выделение и фракционирование белков.....	41
3. Количественная и качественная оценка растительных белков: методы и практическое применение.....	42

Лабораторная работа № 13. Проведение разделения белков из растительного сырья методом электрофореза в ПААГе в редуцирующих условиях.....	44
Лабораторная работа № 14. Проявление электрофореграмм с помощью красителя кумасси.....	51
Лабораторная работа № 15. Определение молекулярной массы белка в геле.....	52
4. Современные методы анализа белков растений	53
IV. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ: ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРОФИЛИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ.....	56
1. Метаболическое разнообразие: первичные и вторичные метаболиты в растительных системах.....	56
2. Углеводы.....	57
Лабораторная работа № 16. Экстракция углеводов из растительного сырья.....	57
Лабораторная работа № 17. Количественное определение гексоз по реакции с антроном.....	60
3. Уроновые кислоты	61
Лабораторная работа № 18. Количественное определение гексуроновых кислот по реакции с карбазолом	62
4. Фенольные соединения.....	63
Лабораторная работа № 19. Определение антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе	63
5. Флавоноиды.....	64
Лабораторная работа № 20. Определение содержания суммы флавоноидов в препарате «Доппельгерц Нервотоник»	65
Лабораторная работа № 21. Определение суммы флавоноидов в ели обыкновенной шишках, в пересчете на цинарозид.....	67
6. Дубильные вещества	72
7. Органические кислоты растений.....	74
Лабораторная работа № 24. Количественный анализ суммы свободных органических кислот алкалиметрическим титрованием с использованием индикаторов в витаминном сборе № 1	76
Лабораторная работа № 25. Количественный анализ суммы свободных органических кислот потенциметрическим титрованием в плодах шиповника.....	77
Лабораторная работа № 26. Количественный аскорбиновой кислоты в плодах рябины обыкновенной методом йодатометрического титрования	79
8. Минералы в растениях.....	80
Лабораторная работа № 27. Количественное определение кальция (Ca) и магния (Mg) в листьях крапивы двудомной комплексометрическим методом.....	81
Литература	84

Предисловие

Мир биологии растений столь же обширен и запутан, как и экосистемы, которые они поддерживают. От мельчайших клеточных процессов до грандиозных экологических взаимодействий — растения играют важнейшую роль в поддержании жизни на Земле. В этом учебном пособии, предназначенном для начинающих и опытных исследователей, рассматриваются основные методы и методики, используемые в исследованиях биологии растений. Она предлагает всесторонний взгляд на фундаментальные аспекты ДНК, РНК, белков и метаболитов в растениях, проливая свет на сложный механизм, который управляет жизнью растений.

В первом разделе «Расшифровка чертежа жизни: Методы выделения и анализа ДНК растений» мы исследуем молекулярные основы жизни растений. Мы начнем с обзора структуры и функции ДНК растений, который заложит основу для понимания генетической информации и ее роли в росте и развитии растений. Затем мы рассмотрим различные методы выделения, количественного определения и оценки качества ДНК, необходимые для любого генетического исследования. В конце раздела подробно рассматриваются методы анализа ДНК, освещаются современные методики, позволяющие расшифровать генетические инструкции в клетках растений.

Во втором разделе «Транскрипция жизни: Выделение РНК и анализ экспрессии генов» переключаем внимание на РНК, посредника между ДНК и белками. Мы начинаем с введения в РНК-интерференцию (РНКи) у растений — мощный инструмент для регулирования экспрессии генов. Далее следует всестороннее освещение методов выделения РНК, а также методов количественного определения и оценки качества РНК. Понимание этих процессов крайне важно для изучения экспрессии генов и регуляции признаков растений.

Белки, «рабочие лошадки клетки» находятся в центре внимания третьего раздела «Белки в действии: Изоляция и функциональный анализ растительных белков». Здесь мы рассматриваем полиморфизм белков и ферментов в культурных растениях, что позволяет понять разнообразие и функциональность этих жизненно важных молекул. Подробно обсуждаются методы выделения растительных белков, а также применение электрофоретических методов анализа для изучения структуры и функции белков. Эти методики имеют решающее значение для понимания биохимических путей, определяющих физиологию растений.

Заключительный раздел «Метаболические пути: Изолирование и профилирование растительных метаболитов» погружает в разнообразный мир растительных метаболитов. В этом разделе рассматривается выделение и профилирование ключевых метаболитов, таких как углеводы, урсоловые кислоты, фенольные соединения, флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты и минералы. В каждом подразделе подробно рассматриваются методики, используемые для изучения этих соединений, подчеркивается их значение в метаболизме растений и потенциальное применение в сельском хозяйстве, медицине и промышленности.

Современная селекция растений стоит на пороге революционной эры, используя эти сложные методы для повышения устойчивости, продуктивности и питательной ценности культур. Выделяя и анализируя ДНК растений,

исследователи могут определять и отбирать желаемые генетические признаки с непревзойденной точностью, ускоряя процесс селекции и позволяя выводить новые, улучшенные сорта растений. Анализ РНК и исследования экспрессии генов еще более совершенствуют этот процесс, позволяя тонко настраивать регуляцию генов и вводить признаки, повышающие стрессоустойчивость, устойчивость к заболеваниям и общую производительность растений. Изучение и манипулирование растительными белками позволяет получить представление о ферментативной активности и метаболических путях, что дает информацию о стратегиях селекции, направленных на оптимизацию роста и развития растений. Профилирование метаболитов, особенно таких соединений, как фенолы и органические кислоты, открывает дополнительные возможности для улучшения здоровья растений и повышения их питательности, что напрямую влияет на продовольственную безопасность и устойчивость.

В учебном пособии мы стремимся предоставить подробный и доступный ресурс для понимания сложных методов и процессов, связанных с исследованиями в области биологии растений. Если вы студент, исследователь или просто энтузиаст науки о растениях, мы надеемся, что это руководство вдохновит вас на изучение удивительного мира растений и позволит применить полученные знания в современной селекции растений.

I. РАСШИФРОВКА ЧЕРТЕЖА ЖИЗНИ: МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ДНК РАСТЕНИЙ

1. Обзор структуры и функции ДНК у растений

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) — это основной генетический материал, который несет в себе инструкции для роста, развития и размножения всех живых организмов, включая растения. Структура и функции ДНК имеют решающее значение для понимания генетического состава и закономерностей наследования у растений.

ДНК — это молекула с двойной спиралью, состоящая из двух нитей, которые обвиваются друг вокруг друга. Каждая нить состоит из последовательности нуклеотидов, которые состоят из сахара (дезоксирибозы), фосфатной группы и одного из четырех азотистых оснований: аденина (A), тимина (T), гуанина (G) или цитозина (C). Две нити удерживаются вместе водородными связями между комплементарными парами оснований: аденин — с тимином, а гуанин — с цитозином (Рис. 1).

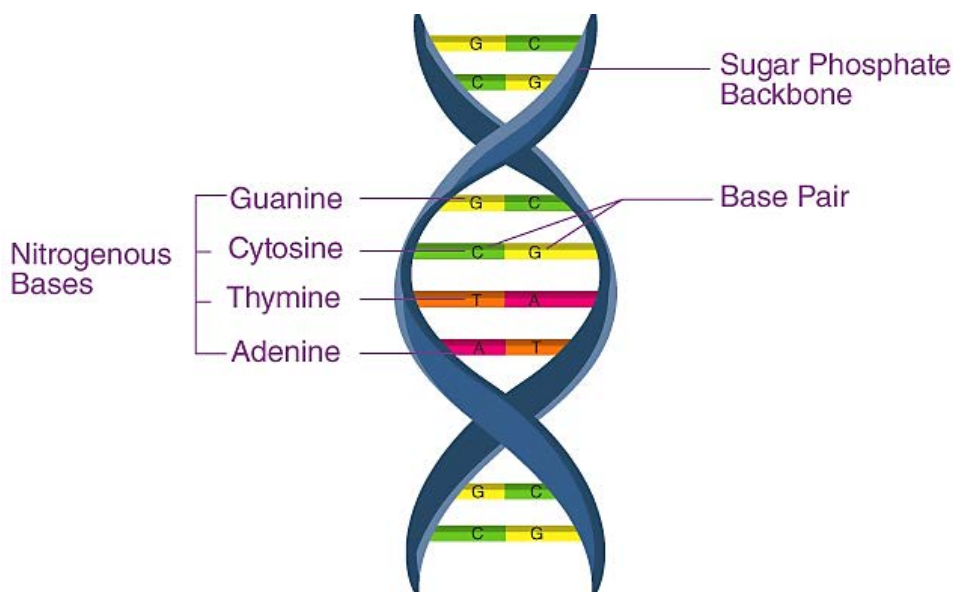


Рис. 1. Структура ДНК

ДНК служит «чертежом» жизни, в ней закодирована генетическая информация, необходимая для роста, развития и размножения растений. В ней содержатся инструкции по синтезу белков, которые являются строительными блоками клеток и выполняют различные функции в растениях. Генетическая информация, хранящаяся в ДНК, организована в единицы, называемые генами. Гены — это определенные последовательности ДНК, которые кодируют определенные белки или функциональные молекулы РНК. Экспрессия генов регулируется различными механизмами, что позволяет растениям адаптироваться к окружающей среде и реагировать на различные стимулы. В общем, ДНК — это фундаментальный генетический материал, который несет в себе инструкции для жизни растений. Понимание

структуры и функции ДНК имеет решающее значение для изучения генетики, эволюции и селекции растений, а также для разработки новых технологий в области биотехнологии и генной инженерии растений.

Итак, у растений генетическая информация хранится в двух основных местах: ядре и органеллах (хлоропластах и митохондриях). Каждый из этих отсеков содержит отдельный геном со своими характеристиками и функциями.

Ядерный геном — самая большая и сложная часть генома растений. Он расположен в ядре растительных клеток и содержит большую часть генетической информации, необходимой для роста, развития и размножения растений. Знания о ядерном геноме растений могут быть дополнены такими характеристиками, как размер генома, содержание генов, количество повторяющихся последовательностей и события полиплоидии/дупликации. Ядерный геном растений состоит из ДНК, распределенной между хромосомами и содержащей кодирующие последовательности генов, а также регуляторные последовательности, повторяющиеся ДНК и различные классы тандемно повторяющихся последовательностей. Ядерная ДНК организована в виде хроматина, где ДНК обернута вокруг гистоновых белков, образуя нуклеосомы. Полученный хроматин далее организуется в линейные хромосомы. Каждый вид растений обладает характерным числом, размером и морфологией хромосом. Наблюдается 2350-кратный диапазон разнообразия размеров геномов растений, а гаплоидное число хромосом может варьировать от 2 до 600. Полиплоидия, дупликация генома/хромосомы и амплификация мотивов ДНК с образованием повторяющейся ДНК могут быть объяснены вариациями размеров генома. Некоторые структурные особенности хромосом хорошо сохранились, такие как центромеры, теломеры и упаковка хроматина. Структура и организация генома растений являются ключом к репликации, транскрипции и передаче генома, что позволяет дублировать и физически реорганизовывать весь геном. С развитием технологий секвенирования были секвенированы черновые или целые геномы многих видов растений. Доступность последовательностей геномов различных видов растений открыла новые возможности для генной инженерии, включая редактирование генома для улучшения сельскохозяйственных культур.

Органеллярные геномы растений, в частности геномы хлоропластов и митохондрий, необходимы для выполнения различных клеточных функций, включая фотосинтез и дыхание. Каждый органеллярный геном имеет уникальные особенности и компоненты, которые способствуют его функционированию.

Хлоропласты — это органеллы, находящиеся в клетках растений и отвечающие за фотосинтез. Они содержат собственный геном, известный как геном хлоропласта или пластома. Геном хлоропласта представляет собой круглую молекулу ДНК, обычно гораздо меньшую, чем ядерный геном. Геном хлоропласта высококонсервативен среди видов растений, имеет сходное содержание и организацию генов. У растений геном хлоропластов наследуется по материнской линии, то есть передается потомству от женщины-родительницы (Рис. 2). Геном хлоропласта кодирует белки, участвующие в фотосинтезе и других важнейших функциях хлоропласта. Основные компоненты генома хлоропласта включают около 100–200 генов, которые

кодируют белки, участвующие в фотосинтезе, цепи переноса электронов и других важнейших метаболических процессах. К ним относятся гены рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (RuBisCO), АТФ-синтазы и различных компонентов фотосистем (PSI и PSII), и другие; и также гены рРНК, кодирующие рибосомальные РНК (рРНК), которые необходимы для синтеза белка в хлоропласте. Обычно это гены 16S, 23S, а иногда и 4,5S рРНК.

Митохондрии — это органеллы, расположенные в клетках растений, которые отвечают за клеточное дыхание и производство энергии. Они также содержат собственный геном, известный как митохондриальный геном. Митохондриальный геном — это круговая молекула ДНК, обычно более крупная и изменчивая по сравнению с геномом хлоропласта. У растений митохондриальный геном также наследуется по материнской линии (Рис. 2). Митохондриальный геном кодирует белки, участвующие в клеточном дыхании, и таким образом участвует в производстве энергии. Основные компоненты митохондриального генома включают около 50–100 генов, которые кодируют белки, участвующие в окислительном фосфорилировании и цикле трикарбоновых кислот (ТКА).

Ключевые гены включают гены оксидазы цитохрома с, АТФ-синтазы и различных компонентов электронно-транспортной цепи. Более того, как и геном хлоропласта, геном митохондрий содержит гены рРНК, необходимые для синтеза белка. Обычно он включает гены 18S и 26S рРНК.

Геномы хлоропластов и митохондрий жизненно важны для метаболизма растений и производства энергии. Они содержат гены важнейших белков, рРНК, тРНК и регуляторные последовательности, все из которых способствуют выполнению функций органелл. Понимание этих компонентов имеет решающее значение для исследований в области биологии, генетики и биотехнологии растений. Считается, что эти органеллы возникли в результате эндосимбиотических событий с участием предковых прокариотических организмов. Этот эволюционный переход позволил растениям более эффективно использовать энергию посредством фотосинтеза и клеточного дыхания.

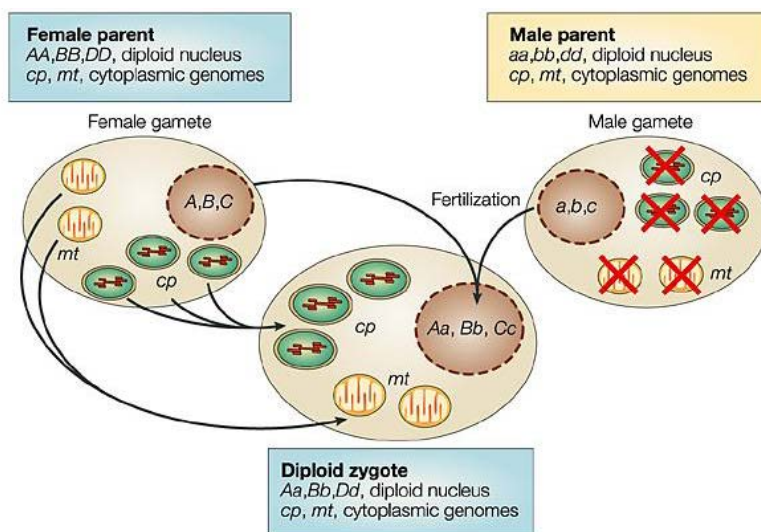


Рис. 2. Наследование цитоплазматических и ядерных генов

ДНК-анализ является фундаментальным аспектом современной селекции и исследований растений, предлагая множество преимуществ по сравнению с традиционными методами.

Например, селекция с помощью маркеров (MAS) позволяет селекционерам выявлять и отбирать желаемые признаки с большей эффективностью, используя ДНК-маркеры, особенно для сложных признаков, которые трудно контролировать с помощью обычных методов селекции. MAS широко использовался для улучшения сортов риса на устойчивость к бактериальному увяданию и blastu, а также на засухоустойчивость и содержание белка в зерне.

Кроме того, ДНК-маркеры могут использоваться для оценки генетического разнообразия родительских линий, что повышает эффективность процесса селекции. Эта информация имеет большое значение для создания улучшенных сортов с повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам.

Анализ ДНК, особенно с использованием таких методов, как SSR-маркеры, позволяет идентифицировать гибриды и разрабатывать ДНК-штрих-коды для защиты сортов. Это важный момент в контексте защиты сортов растений в глобальном масштабе.

Анализ некодирующих областей хлоропластной и митохондриальной ДНК может способствовать выяснению филогенетических отношений между культивируемыми, сорными и дикими видами. Эти знания имеют большое значение для обогащения культурных растений функциональными признаками, полученными от диких видов в ходе селекции.

Кроме того, анализ метилирования ДНК может способствовать выяснению регуляторных механизмов, лежащих в основе экспрессии генов, роста и развития, гетерозиса и реакции на стресс у растений. Эти знания могут быть использованы в селекционных программах для выведения сортов с повышенной устойчивостью к стрессу и улучшенными характеристиками.

В заключение следует отметить, что применение анализа ДНК изменило область селекции и исследований растений, способствуя более эффективному отбору желательных признаков, пониманию генетического разнообразия и взаимосвязей, защите сортов растений, а также получению знаний об эпигенетической регуляции и структуре хромосом.

2. Методы выделения ДНК

Эффективное разрушение клеточных стенок — важнейший аспект, который необходимо учитывать при извлечении ДНК из растительных тканей. Значительное количество методов, используемых для этой цели, приводит к сильной фрагментации ДНК, что объясняется гидродинамическими разрывами в цепи. Часто необходимо найти баланс между размером ДНК и ее количественным выходом, учитывая, что молекулы ДНК представляют собой самый большой класс полимерных биомакромолекул. Выделение высокомолекулярной ДНК из клеток представляет собой лишь один аспект проблемы, поскольку растительные экстракты содержат значительное количество белков, полисахаридов, дубильных веществ и пигментов, которые в некоторых случаях особенно сложно отделить от ДНК.

Механическое измельчение растительных тканей в присутствии детергентов, растворяющих клеточные мембраны, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз путем связывания двухвалентных катионов, является распространенным методом разрушения тканей. Белки комплекса DNP удаляются в процессе фенольной депротеинизации образца. В некоторых методиках для освобождения ДНК от белков хроматина используются протеиназы. После депротеинизации препарат остается значительно загрязненным полисахаридами.

Использование двух детергентов, СТАВ (цетилтриметил аммоний бромид) и SDS (додецилсульфат натрия), является общепринятой практикой в этой области. Метод с использованием ЦТАБ (Rogers and Bendich, 1985) позволяет получить препараты ДНК растений достаточной чистоты для проведения ПЦР, рестрикционного и гибридизационного анализа. ЦТАБ эффективно растворяет клеточные мембраны. Кроме того, использование этого поверхностно-активного вещества позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку в его присутствии они проявляют различную растворимость. При повышенной концентрации соли нуклеиновые кислоты образуют с ЦТАБ устойчивые, но растворимые комплексы. При снижении концентрации соли до уровня ниже 0,4 М NaCl комплексы ЦТАБ с нуклеиновыми кислотами выпадают в осадок, в то время как большая часть полисахаридов остается в растворе. Затем осадок еще раз растворяют в 1 М растворе NaCl, после чего ДНК осаждают спиртом.

Другой метод основан на использовании детергентов, в частности SDS, который также солюбилизирует биомембраны и быстро денатурирует белки (при этом инактивируя нуклеазы). Модификация одного из таких методов, первоначально разработанного Деллапортой и др. (Dellaporta et al., 1985), описана ниже. При 0°C белки и полисахариды в растительных экстрактах образуют комплексы с SDS и выпадают в осадок, в то время как нуклеиновые кислоты остаются в растворе. Высокомолекулярная ДНК, впоследствии очищенная от белков фенолом, осажденная спиртом и растворенная в соответствующих буферах, пригодна для рестрикции и ПЦР.

Лабораторная работа № 1. **Выделение ДНК методом СТАВ**

Метод СТАВ (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) — это традиционный и широко используемый протокол для выделения геномной ДНК из растительных тканей.

Реактивы:

1. Буфер для экстракции СТАВ:
 - 2 % СТАВ (w/v);
 - 1,4 М NaCl;
 - 0,1 М Трис-HCl (pH 8,0);
 - 0,02 М ЭДТА (pH 8,0);
 - 0,2 % β-меркаптоэтанола (добавляется непосредственно перед использованием).
2. Хлороформ:изоамиловый спирт (24:1).
3. Изопропанол (холодный).

4. 70 % этанол (для промывки ДНК).
5. TE Buffer (для ресуспендирования ДНК):
 - 10 мМ Трис-НCl (pH 8,0);
 - 1 мМ ЭДТА (pH 8,0).

Оборудование:

1. Ступка и пестик.
2. Центрифуга (с частотой вращения 13 000 об/мин).
3. Водяная баня или термостат (установленный на 65 °C).
4. Пипетки и наконечники.
5. Микроцентрифужные пробирки.
6. Вортекс-миксеры, вихревые мешалки.

Протокол выделения ДНК:

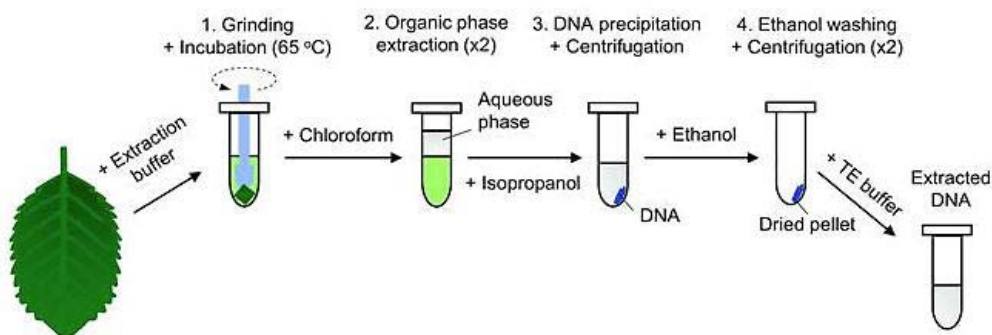


Рис. 3. Этапы выделения ДНК растения
(DOI:10.3390/INVENTIONS6020029)

1. Подготовка тканей:

– 50–100 мг сухой или 200 мг свежей ткани растереть в ступках. Если ткань была заморожена, растирать нужно в жидком азоте. Добавить 800 мкл экстрагирующего буфера СТАВ либо, используя пестик, произвести гомогенизацию непосредственно в буфере. Гомогенат тщательно перемешать.

2. Лизис клеток:

– Добавьте до 1 мл предварительно подогретого буфера для экстракции СТАВ и тщательно перемешайте.

– Инкубируйте при 65°C в течение 30–60 минут, периодически перемешивая.

3. Разделение фаз:

– Дайте смеси остыть до комнатной температуры.

– Добавьте равный объем хлороформа:изоамилового спирта (24:1) и аккуратно перемешайте.

– Центрифугируйте при 13 000 об/мин в течение 10 минут для разделения фаз.

4. Осаждение ДНК:

– Перенесите верхнюю водную фазу в новую пробирку с помощью дозаторов.

– Добавьте равный объем изопропанола и аккуратно перемешайте.

– Инкубируйте в морозильник не менее 30 минут для осаждения ДНК.

– Центрифугируйте при 13 000 об/мин в течение 10 минут для осаждения ДНК.

Конец ознакомительного фрагмента.

Приобрести книгу можно

в интернет-магазине

«Электронный универс»

e-Univers.ru