

## ВИДІЛЕННЯ РНК З БАГАТИХ НА ФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ ТКАНИН

**П.С.Тихонов**

*Одеський державний аграрний університет*

*Встановлено умови виділення з багатих на фенольні сполуки тканин плодів яблунь гетерогенних за молекулярною масою препаратів тотальної та полі(A)<sup>+</sup>РНК.*

**Ключові слова:** тотальна РНК, полі(A)<sup>+</sup> РНК, плоди яблунь.

**Вступ.** Плоди та ягоди багатьох важливих сільськогосподарських рослин багаті на різні фенолвмісні сполуки [1,2,3]. Ці метаболіти можуть взаємодіяти з нуклеїновими кислотами під час виділення останніх з тканин і таким чином впливати на якість одержаних препаратів нуклеїнових кислот.

Метою цієї роботи була розробка методу виділення РНК, що придатна для подальших досліджень регуляції експресії генів, з багатих на фенольні сполуки тканин.

**Матеріали досліджень.** Дослідження проводили на плодах яблуні сорту Слава переможцям різних стадій стиглості: через 14 та 60 діб після запилення.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Тотальну РНК виділяли наступним чином.

Наважку тканини заморожували у рідкому азоті та дрібнили у лабораторному подрібнювачі ЕМ-3А.

До подрібненої маси додавали буфер для екстракції: 200 мМ Na-борат, рН 9,0, 1% додецилсульфат натрію, 30 мМ ЕДТА (етиленадіамінтетраоцтова кислота), 5 мМ ДТТ (дитіотреїтол), 1 мМ АТК (ауринтрикарбонова кислота) і ретельно перемішували до однорідної маси.

Безпосередньо перед розтиранням у порцеляновій ступці до маси додавали 20% полівінілпіролідон К90.

Гомогенат центрифугували при 10000 g протягом 20 хвилин при 4<sup>0</sup> С для видалення незруйнованих клітин.

Рідину, що залишилася над осадом фільтрували через Miracloth, додавали КСІ до 0,1М для видалення додецилсульфату натрію. Осад, що утворився видаляли центрифугуванням при 10000 g протягом 20 хвилин при 4<sup>0</sup> С.

До рідини, що залишилася над осадом після центрифугування додавали рівний об'єм суміші фенол/хлороформ та інтенсивно струшували протягом 1-2 хвилин. Суспензію центрифугували при 10000 g протягом 10 хвилин при 4<sup>0</sup>С і відбирали для подальшої роботи верхню водну фазу.

До водної фази додавали до 1% ЦТАБ (цетилтриметиламоній бромід) та до 0,5 М КСl. Суміш витимували 30 хвилин при 60<sup>0</sup>С при періодичному перемішуванні, потім додавали рівний об'єм хлороформу та інтенсивно струшували протягом 1-2 хвилин.

Суміш центрифугували при 10000 g протягом 10 хвилин при 4<sup>0</sup>С і відбирали для подальшої роботи верхню водну фазу.

До водної фази додавали LiCl до 3М і залишали на ніч при 4<sup>0</sup>С для випадіння РНК в осад.

РНК збирали центрифугуванням при 10000 g протягом 20 хвилин при 4<sup>0</sup>С. Осад промивали 2 рази 3М LiCl з наступним центрифугуванням за зазначених вище умов.

РНК, що випала в осад збирали центрифугуванням, промивали 3М LiCl і розчиняли у мінімальному об'ємі Н<sub>2</sub>О.

Розчин РНК центрифугували, рідину, що залишалася над осадом, відбирали, додавали до неї Na-ацетат до 0,2М та 2,5 об'єму етанолу і залишали при -20<sup>0</sup>С на 60 хвилин.

РНК, що випала в осад, збирали центрифугуванням за зазначених вище умов.

Далі двічі РНК переводили в осад з мінімального об'єму за допомогою етанолу.

РНК, що містить полі(А) виділяли наступним чином.

Осад РНК розчиняли у Н<sub>2</sub>О, додавали рівний об'єм двократного буферу для нанесення (20 мМ трис-НСl, рН 7,6, 1М NaCl, 10 мМ ЕДТА, 0,5% додецилсульфат натрію) і наносили на колонку з оліго(dT)-целюлозою [4]. Колонку промивали буфером для нанесення до виходу матеріалу, що не зв'язався.

Для видалення РНК, що зв'язалася неспецифічно, колонку промивали буфером зі зниженою іонною силою (10 мМ трис-НСl, рН 7,6, 0,1М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,25% додецилсульфат натрію).

Елюцію РНК, що містить полі(А) проводили буфером, що не містить солі (10 мМ трис-НСl, рН 7,6, 5 мМ ЕДТА, 0,25% додецилсульфат натрію).

Концентрацію РНК визначали спектрофотометрично, беручи до уваги, що при d=1 см 1 одиниця оптичної щільності при 260 нм дорівнює 40 мкг РНК [5].

Вихід тотальної РНК складав 25 мкг на 1 г сирової маси плоду на 14-ту добу після запилення та 37 мкг на 1 г сирової маси плоду на 60-ту добу після запилення. Тобто спостерігалось незначне, приблизно у 1,5 рази, збільшення вмісту РНК на більш пізній стадії розвитку плоду. Вихід полі(А)+ РНК був 1,0 – 1,2% від загальної кількості РНК, що була нанесена на колонку з оліго(dT)-целюлозою незалежно від стадії розвитку плоду.

Чистоту препаратів РНК визначали спектрофотометрично, зважаючи, що для чистої РНК характерні співвідношення  $E_{260}/E_{280} \geq 2,0$  та  $E_{260}/E_{240} \geq 2,3$  [6]. Оптичні показники виділених препаратів РНК свідчать про високу ступінь чистоти :  $E_{260}/E_{280} \geq 2,1$  та  $E_{260}/E_{240} \geq 2,3$ .

Якість препаратів РНК оцінювали також електрофоретично. Електрофорез проводили за денатуруючих умов у 2%-ій агарозі з 7М сечовиною, що були приготовлені на 25 мМ лимонній кислоті, рН 3,5. Буфер для зразків РНК містив 7М сечовину та 25 мМ лимонну кислоту, рН 3,5.



Рис.1. Електрофореграми препаратів тотальної РНК з плодів яблуні через 14 діб (трек 1) та 60 діб (трек 2) після запилення.

Як електродний буфер використовували 25 мМ лимонну кислоту. Електрофорез проводили в горизонтальній пластині при 20 мА на пластину геля до виходу бромфенолового синього з гелю. Гелі забарвлювали розчином етідіумбромиду [7] та фотографували при ультрафіолетовому опромінюванні.

При електрофорезі в препараті тотальної РНК визначали дискретні компоненти, що є 18S та 28S рРНК  $0,7 \times 10^6$  Д та  $1,4 \times 10^6$  Д відповідно та дифузну зону в інтервалі  $1,0 - 0,17 \times 10^6$  Д (рис.1). У дифузній зоні розташовані гетерогенні за розмірами РНК, що присутні у невеликій кількості копій.

Аналіз препаратів РНК, що містять полі(А) показав наявність дискретних компонентів в інтервалі  $1,0 - 0,17 \times 10^6$  Д (рис.2) та деяку кількість рРНК, що не відокремилася за умов афінної хроматографії. Дискретні компоненти є видами полі(А)<sup>+</sup>РНК, що переважають у вивчаємих препаратах. В цілому електрофоретичні профілі РНК, що містить полі(А) та

тотальної РНК схожі. У той же час кількісні співвідношення вмісту окремих компонентів різняться. У препараті тотальної РНК найбільша кількість РНК припадає на рРНК. В РНК, що містить полі(А) інтенсивність забавлення

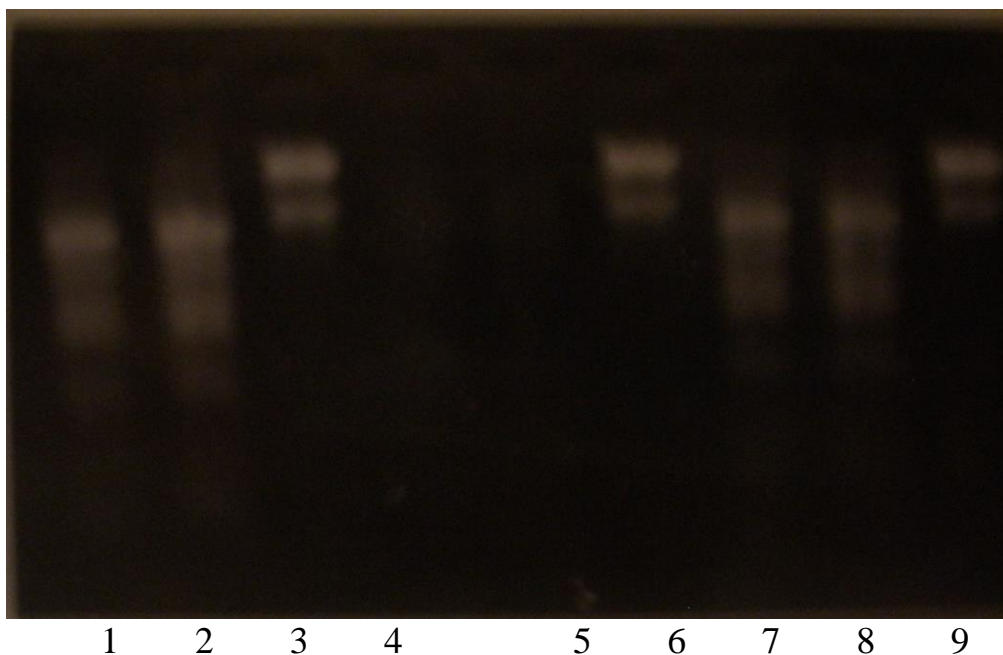


Рис.2. Електрофореграми препаратів полі(А)<sup>+</sup>РНК з плодів яблуні через 14 діб (треки 1, 7) та 60 діб (треки 2, 8) після запилення.  
Треки 3, 6, 9 – 28S та 18S рРНК плодів яблуні.  
Треки 4, 5 – без РНК.

компонентів рРНК зменшується, а дискретних компонентів, що знаходяться в інтервалі  $1,0 - 0,17 \times 10^6$  Д збільшується.

Спектральні характеристики тотальної РНК, що була виділена з плодів різних стадій стиглості практично не відрізнялися. Електрофоретичний аналіз також не виявив суттєвої різниці у компонентному складі тотальної РНК та РНК, що містить полі(А) з плодів різних стадій стиглості.

**Висновки.** Таким чином, спектри оптичної щільності виділених препаратів РНК свідчать про їх високу ступінь чистоти. Електрофоретичний аналіз свідчить про гетерогенність препаратів РНК, що у свою чергу вказує на можливість існування окремих класів переважаючих мРНК у плодів яблунь різних стадій стиглості.

### Список літератури

1. Физиология винограда и основы его возделывания /под ред. К.Стоева//София.: Издательство Болгарской Академии Наук – 1983 – т.2. – 382с.
2. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высшая школа. – 1974. – 214с.

3. Куян В.Г. Спеціальне плодівництво. – К.: Світ. – 2004 – 464с.
4. Beachy R.N., Barton K.A., Madison J.T., Thompson J.F., Jarvis N.P. The mRNAs that code for soybean seed proteins. – Genome organization and expresión in plants. – New York and London.: Plenum Press. – 1980 – p.273-281.
5. Георгиев Г.П. Методы определения, выделения и фракционирования нуклеиновых кислот. – Л.: Медицина. – 1968 – с.74-120.
6. Любимова Е.В., Подобед О.В. Метод выделения и очистки содержащей поли(А) мРНК из клеток млекопитающих. – В: Современные методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1977 – с.316-321.
7. Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M., Boedtker H. RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. – Biochemistry. – 1977 – v.16 – p.4743-4751.

***Тихонов П.С. Выделение РНК из богатых фенольными соединениями тканей.***

*Определены условия выделения из богатых фенольными соединениями тканей плодов яблонь гетерогенных по молекулярной массе препаратов тотальной и поли(А)<sup>+</sup>РНК.*

**Ключевые слова:** тотальная РНК, поли(А)<sup>+</sup>РНК, плоды яблонь.

***Tykhonov P.S. RNA extraction from tissues rich in phenolic compounds.***

*Procedure for isolating of heterogeneous in molecular weight total and poly(A)<sup>+</sup>RNA from apple fruit tissues rich in phenolic compounds has been developed.*

**Key words:** total RNA, poly(A)<sup>+</sup>RNA, apple fruit.