

УДК 635.262:577.213/216

ВИДІЛЕННЯ РНК З ЦИБУЛИН ЧАСНИКУ (*ALLIUM SATIVUM* L.)

П.С.Тихонов

Одеський державний аграрний університет

Встановлено умови виділення з багатих на фенольні сполуки тканин цибулин часнику гетерогенних за молекулярною масою препаратів тотальної та полі(A)⁺РНК.

Ключові слова: тотальна РНК, полі(A)⁺ РНК, цибулини часнику.

Вступ. Плоди, ягоди та вегетативні частини багатьох важливих сільськогосподарських рослин багаті на різні фенольні сполуки [1,2,3,4]. Вони можуть взаємодіяти з нуклеїновими кислотами і 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 цибулинах часнику сорту Український білий гуляйпільський та дикому виді, що розрізнялися за стійкістю до фузаріозу.

Результати дослідження та їх обговорення. Тотальну РНК виділяли як описано раніше [5] з деякими модифікаціями.

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 (етилендіамінтетраоцтова кислота), 5 мМ ДТТ (дитіотреїтол), 1 мМ АТК (ауринтрикарбонова кислота).

Безпосередньо перед подрібненням до маси додавали 20% полівінілпіролідон К90.

Гомогенат центрифугували при 10000 g протягом 20 хвилин при 4⁰ 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 4⁰ С.

До рідини, що залишилася над осадом після центрифугування додавали рівний об'єм суміші фенол/хлороформ та інтенсивно струшували протягом 1-

2 хвилини. Суспензію центрифугували при 10000 g протягом 10 хвилин при 4°C і відбирали для подальшої роботи верхню водну фазу.

До водної фази додавали до 1% ЦТАБ (цетилтриметиламоній бромід) та до 0,5 М КСІ. Суміш витимували 15 хвилин при 60°C 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°C і відбирали для подальшої роботи верхню водну фазу.

До водної фази додавали LiCl до 3М і залишали на ніч при 4°C для випадіння РНК в осад.

РНК збирали центрифугуванням при 10000 g протягом 20 хвилин при 4°C. 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 H₂O.

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°C на 60 хвилин.

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

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

Осад РНК розчиняли у H₂O, додавали рівний об'єм двократного буферу для нанесення (20 мМ трис-НСІ, рН 7,6, 1М NaCl, 10 мМ ЕДТА, 0,5% додецилсульфат натрію) і наносили на колонку з оліго(dТ)-целюлозою [6]. Колонку промивали буфером для нанесення до виходу матеріалу, що не зв'язався.

Елюцію РНК, що містить полі(А) проводили буфером, що не містить солі (10 мМ трис-НСІ, 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 [7].

Вихід тотальної РНК складав 15 мкг на 1 г сирі маси цибулини. Вихід полі(А)+ РНК був 0,8 – 1,0% від загальної кількості РНК, що була нанесена на колонку з оліго(dТ)-целюлозою.

Чистоту препаратів РНК визначали спектрофотометрично, зважаючи, що для чистої РНК характерні співвідношення $E_{260}/E_{280} \geq 2,0$ та $E_{260}/E_{240} \geq 2,3$ [8]. Оптичні показники виділених препаратів РНК свідчать про високу ступінь чистоти : $E_{260}/E_{280} \geq 2,2$ 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.

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 [9] та фотографували при ультрафіолетовому опромінуванні.

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. 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.

Висновки. Таким чином, спектри оптичної щільності виділених препаратів РНК свідчать про їх високу ступінь чистоти. Електрофоретичний аналіз свідчить про гетерогенність препаратів РНК, що вказує на існування окремих класів переважаючих мРНК у цибулинах часнику.

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. Федосов А.І., Кисличенко В.С., Новосел О.М. Визначення кількісного вмісту суми фенольних сполук в артишоку суцвіттях, часнику листі та цибулинах. – Медична та клінічна хімія. – 2018 – т.20 – № 1 – с.101-104.
5. Тихонов П.С. Виділення РНК з багатих на фенольні сполуки тканин. – Аграрний вісник Причорномор'я: Зб. наук. праць–Одеса. – 2011. – вип.59 с.136-140.
6. 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.
7. Георгиев Г.П. Методы определения, выделения и фракционирования нуклеиновых кислот. – Л.: Медицина. – 1968 – с.74-120.
8. 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.
9. 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 луковиц чеснока (*Alium sativum* L.).

Определены условия выделения из богатых фенольными соединениями тканей луковиц чеснока гетерогенных по молекулярной массе препаратов тотальной и поли(А)⁺РНК.

Ключевые слова: тотальная РНК, поли(А)⁺РНК, луковицы чеснока.

Tykhonov P.S. RNA extraction from garlic bulbs (*Alium sativum* L.).

Procedure for isolating of heterogeneous in molecular weight total and poly(A)⁺RNA from garlic bulb tissues rich in phenolic compounds has been developed.

Key words: total RNA, poly(A)⁺RNA, garlic bulbs.