

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### **Wpływ metod izolacji DNA na podobieństwo genetyczne linii pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) przy zastosowaniu techniki RAPD-PCR**

AGNIESZKA TOMKOWIAK, DANUTA KURASIAK-POPOWSKA, DOROTA WEIGT,  
SYLWIA MIKOŁAJCZYK

UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii,  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

**Słowa kluczowe:** izolacja DNA, pszenica ozima, polimorfizm markerów RAPD

#### **STRESZCZENIE**

Celem badań było porównanie wpływu 4 metod izolacji DNA na wynik analizy markerami molekularnymi RAPD-PCR (ang. Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction) linii pszenicy ozimej. Przeprowadzono izolację DNA metodą Thomsona i Henry’ego, metodą kolumnkową przy pomocy kitu Quiagen DNeasy Plant Kit, przy pomocy kitu Genomic Mini AX Plant firmy A&A Biotechnology oraz zestawu Maxwell® 16 LEV Plant DNA Kit firmy Promega.

Po izolacji przeprowadzono analizy molekularne RAPD-PCR, które wykorzystano jako wskaźnik służący do oceny metod izolacji DNA. Najlepszą metodą izolacji okazała się metoda z wykorzystaniem Quiagen DNeasy Plant Kit. Jakość DNA otrzymanego po izolacji tym kitem była najwyższa, a otrzymane elektroforegramy były najbardziej czytelne. Jest to jednak metoda izolacji DNA najdłuższa i najdroższa, co ogranicza jej wykorzystanie przy dużej liczbie badanych genotypów. Dobrą metodą izolacji DNA ze względu na jakość otrzymanych obrazów elektroforetycznych była metoda izolacji kitem Genomic Mini AX Plant. Metodą szybką i taną okazała się metoda Thomsona i Henry’ego, niestety mniej wydajną w porównaniu do poprzednich. Metodą o największym zróżnicowaniu ilości otrzymanego DNA była izolacja z wykorzystaniem zestawu Maxwell.

# The effect of DNA isolation methods on genetic similarity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) lines using RAPD-PCR techniques

**Keywords:** isolation of DNA, winter wheat, polymorphism of RAPD markers

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare the effect of 4 DNA isolation methods on the results of analyses using molecular markers of Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) in winter wheat lines. DNA was isolated using the method proposed by Thomson and Henry, the column method with a Quiagen DNeasy Plant Kit, a Genomic Mini AX Plant Kit by A&A Biotechnology and the Maxwell® 16 LEV Plant DNA Kit by Promega.

After isolation RAPD-PCR analyses were carried out. The molecular study was an evaluation indicator of the DNA isolation methods. The best isolation method was that using the Quiagen DNeasy Plant Kit. Isolation using this kit provided the best DNA quality and the greatest legibility of electropherograms. However, it is the most time- and cost-intensive method of DNA isolation, which limits its applicability at a large number of tested genotypes. In terms of electrophoretic image quality good DNA isolation was provided by the method using a Genomic Mini AX Plant Kit. A rapid and cheap method was that proposed by Thomson and Henry; unfortunately, it was less efficient than the former ones. The greatest variation in the amounts of obtained DNA was observed for isolation using the Maxwell kit.

## 1. WSTĘP

Głównym celem izolacji DNA jest uzyskanie w dużej ilości i o wysokiej jakości genomowego DNA z licznych prób przy jednoczesnym oczyszczeniu preparatu z białek i inhibitorów enzymów. Liczba prób jest często czynnikiem limitującym zakres badań. Pomimo że istnieje wiele różnych metod izolacji kwasów nukleinowych, ciągle opracowywane są nowe procedury [1, 2]. Ich celem jest możliwie szybka i skuteczna izolacja DNA, pozwalająca na redukcję kosztów analiz oraz dostarczenie nie zanieczyszczonego DNA w jak największej ilości. Należy pamiętać o tym, że ekstrakcja DNA z tkanek roślinnych różni się w zależności od użytego materiału oraz od dalszego przeznaczenia wyekstrahowanego DNA. W celu zniszczenia ściany komórkowej w większości metod izolacji stosuje się rozcieranie tkanki roślinnej w młynku lub mielenie w homogenizatorze. Oczyszczenie DNA z cząstek stałych następuje przez wirowanie, a rozpuszczalne białka i inne cząsteczki są rozdzielane poprzez ekstrakcję chloroformem oraz wirowanie. Następnie DNA powinno być wytrącone z fazy wodnej i dokładnie przemyte, by usunąć zanieczyszczające próbkę sole. Markery molekularne znajdują szereg zastosowań w hodowli roślin, a głównym celem ich stosowania jest selekcja – MAS (marker assisted selection), która jest stosowana do wyboru osobników o pożądanych cechach. Markery RAPD wykorzystywane są przede wszystkim do badania różnorodności genetycznej oraz identyfikacji odmian linii lub klonów [3]. Zaletą markerów RAPD jest prostota i krótki czas wykonania analizy, niska cena jednostkowa, mała wymagana ilość wyjściowego DNA i łatwość wykonania analiz oraz ich nieduży koszt. Do podstawowych wad zaliczane są problemy z powtarzalnością wyników i dominujący charakter wykrywanych loci [4, 5].

Celem badań było porównanie wpływu 4 metod izolacji DNA na wynik analizy polimorfizmu DNA linii pszenicy ozimej markerami molekularnymi RAPD-PCR (ang. Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction).

Celem badań było porównanie wpływu 4 metod izolacji DNA na wynik analizy polimorfizmu DNA linii pszenicy ozimej markerami molekularnymi RAPD-PCR (ang. Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction).

## 2. MATERIAŁ BADAWCZY I METODYKA

Materiałem roślinnym użytym do badań było 25 genotypów pszenicy ozimej pochodzących ze zbiorów Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Z każdego genotypu do dalszych analiz pobierano 10 losowo wybranych roślin.

### 2.1 Izolacja DNA metodą Thomsona i Henry'ego

Genomowy DNA z linii pszenicy ozimej izolowano zmodyfikowaną metodą Thompсона i Henry'ego [6]. Z dysków liściowych dziesięciu analizowanych

roślin o wielkości 2 mm<sup>2</sup> tworzą próbkę zbiorczą, którą następnie traktowano 200 ml buforu TBS o składzie: 100 mM Tris HCl o pH 9,5; 1 M KCl; 10 mM EDTA; H<sub>2</sub>O dejonizowana (dopełniono do 50 ml). Inkubację przeprowadzono w probówkach Eppendorfa, w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 min.

## **2.2 Izolacja DNA metodą kolumnkową przy pomocy kitu Quiagen DNeasy Plant Kit**

Materiał roślinny w postaci dysków liściowych z 10 badanych roślin o wadze 50-100 mg umieszczano w probówkach Eppendorf. W celu uzyskania homogennej tkanki roślinnej próby zanurzano w ciekłym azocie. Po wyjęciu prób z ciekłego azotu każdą z nich rozcierano moździerzem, następnie dodawano 400 µl buforu AP1 i mieszano do uzyskania jednolitej konsystencji, a na koniec dodawano 3 ml RNAzy o stężeniu 100 mg/ml. Całość inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej oraz 30 min w temperaturze 65°C. Po inkubacji do wszystkich probówek dodawano 130 µl buforu AP2 i mieszano, następnie na 15 min umieszczano próby w lodzie. Po wyjęciu prób z lodu, wirowano je w wirówce firmy Heraeus Biofuge Pico przez 5 min z prędkością 10956 RCF (relative centrifugal force), następnie otrzymany supernatant przenoszono ostrożnie do wcześniej autoklawowanych probówek. Do każdej próby dodawano 250 µl buforu AP3 oraz 500 µl etanolu. Całą objętość roztworu przenoszono na kolumnienki z membraną wiążącą DNA i wirowano przez 2 min z prędkością 3578 RCF. Kolumnienki ze związanym DNA przenoszono na czyste probówki i traktowano je 450 µl buforu AW, a następnie wirowano przez 1 min przy prędkości 3578 RCF. Ponownie przenoszono kolumnienki na czyste probówki i traktowano je 50 µl podgrzanego do 65°C buforu AE oraz inkubowano 20 min w temperaturze pokojowej. Procedurę przemycania buforem elującym AE wykonano dwukrotnie.

## **2.3 Izolacja DNA przy pomocy kitu Genomic Mini AX Plant firmy A&A Biotechnology**

Próbkę materiału roślinnego (ok. 100 mg świeżej masy) umieszczano w probówce typu Eppendorf i dodawano 0,9 ml zawiesiny lizującej LS oraz 20 µl roztworu proteazy. Całość mieszano i inkubowano w 50°C przez 30 min. Po inkubacji próbkę intensywnie wytrząsano przez 15 s, a następnie wirowano 5 min z prędkością 10956 RCF.

W trakcie wirowania równoważono kolumny roztworem K1. Na zrównoważoną kolumnę nanoszono supernatant i płukano ją przez dodanie 1,5 ml roztworu płuczającego K2. Następnie dodawano do kolumny 0,25 ml roztworu elucyjnego K3. Kolejnym krokiem było przeniesienie kolumny na nową probówkę i ponowne dodanie roztworu elucyjnego K3. Do eluatu zawierającego DNA dodawano 0,8 ml mieszaniny precypitacyjnej PM. Całość mieszano i wirowano przy prędkości 3578 RCF. Po odwirowaniu zlewano supernatant (na dnie probówki był widoczny jasnoniebieski osad) i suszono, a następnie płukano w 70% etanolu. Po wysuszeniu osad zawieszano w jałowej wodzie destylowanej.

## **2.4 Automatyczna izolacja DNA przy pomocy zestawu Maxwell® 16 LEV Plant DNA Kit firmy Promega**

Izolacja została przeprowadzona zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Metoda oparta jest o zastosowanie syntetycznego, kompozytowego złoża magnetycznego, selektywnie wiążącego kwasy nukleinowe DNA i RNA. Materiał roślinny w ilości 20 mg pochodzący ze świeżych liści z 10 analizowanych roślin umieszczano na spodzie probówki o objętości 1,5 ml, następnie dodawano kompozytowe złożo magnetyczne oraz 300 µl buforu lizującego TLA (Tail Lysis Buffer). W kolejnym etapie uruchamiano urządzenie korzystając z opcji DNA i Plant protocol, z czasem i prędkością zalecaną przez producenta zestawu. Następnie probówki z ekstraktem wirowano przez 2 min przy prędkości 10956 RCF, po czym próby uzupełniano 300 µl wody (nuclease free water). Płynny lizat z każdej próby przenoszono do nowych probówek.

## **2.5 Analiza polimorfizmu markerów RAPD**

Dla otrzymanych preparatów wykonano pomiary stężenia i czystości ekstraktów DNA posługując się urządzeniem Nanodrop. Spektrofotometry tego typu charakteryzują się skróconą drogą optyczną oraz zachowują bardzo dużą dokładność pomiaru i wymagają niewielkich ilości materiału do oznaczeń. W Tabeli 1 zamieszczono koncentrację DNA badanych prób w ng/µl oraz stosunek absorbancji przy 260 nm i 280 nm. Następnie rozcieńczano otrzymane ekstrakty DNA doprowadzając je do stężenia 25 ng/µl. W przypadku każdej z 4 metod izolacji DNA próby przechowywano w temperaturze -20°C.

**Tabela 1** Zawartość genomowego DNA i absorbancja przy dwóch długościach fali dla różnych genotypów pszenicy  
**Table 1** The genomic DNA content and the ratio of two wave lengths absorbance of various genotypes of wheat

Genotyp pszenicy Genotype of wheat	Quiagen DNeasy Plant Kit		Genomic Mini AX Plant		Maxwell® 16 LEV Plant DNA Kit		Thomson & Henry	
	Zawartość DNA DNA content (ng/μl)	Absorbancja Absorbance 260/280	Zawartość DNA DNA content (ng/μl)	Absorbancja Absorbance 260/280	Zawartość DNA DNA content (ng/μl)	Absorbancja Absorbance 260/280	Zawartość DNA DNA content (ng/μl)	Absorbancja Absorbance 260/280
1	246.7	1.82	253.2	1.78	198	1.78	101.3	1.67
2	352.8	1.79	357.8	2.01	196.4	1.79	145	1.75
3	221	1.85	421.2	1.88	211.5	1.99	121.3	1.67
4	263.7	1.99	126.2	1.89	96.3	1.84	98	2.1
5	122.9	1.85	198.1	1.76	189.2	1.87	100	1.8
6	328.6	1.91	98.6	1.79	175.5	1.78	91	1.69
7	398.3	1.99	251.9	1.78	162.5	2.12	89	1.87
8	411.3	1.86	179.6	1.81	289.5	2.43	201	2.4
9	276	1.82	276.1	1.69	163.7	1.98	211	2.25
10	354	1.84	190	1.87	111.2	1.91	98	1.89
11	198.9	1.77	176	1.9	79.2	1.99	123	1.9
12	212.6	1.89	201.1	1.98	99.12	2.02	201	1.59
13	362.6	1.86	176.9	1.72	164.2	2.01	176	1.99
14	98.2	1.88	245.8	1.87	111.4	1.99	123	1.67
15	342.6	1.95	164.9	1.86	67	1.69	79	2.01
16	189.1	1.79	199.5	1.80	89.1	1.76	135	1.78
17	321.3	1.8	90	1.86	143	1.79	198	1.9
18	78.2	1.84	154.7	1.97	253	1.88	76	1.99
19	421.6	1.92	199.2	1.99	110.2	2.01	17	2.1
20	244.1	1.88	311	2.2	112.1	2.08	124	1.68
21	189.4	1.92	178.9	1.9	88	1.79	34	1.9
22	334.8	1.76	254.8	2.14	199	1.89	24	1.78
23	321.3	1.78	143.7	2.16	234.1	1.81	178	1.69
24	96	1.91	173.9	1.78	179	1.84	100	1.67
25	355.2	1.89	80.9	1.64	165	1.9	45	1.55
Średnia Mean	236.75	1.86	191.75	1.88	161.50	1.91	115.91	1.85

Reakcję RAPD-PCR każdorazowo przeprowadzano w objętości 12,5 μl mieszaniny w składzie: woda dejonizowana; DreamTaq PCR Master Mix (2X) firmy ThermoScientific; starter firmy Operon Technologies o stężeniu – 20 pm/μl; ekstrakt DNA o stężeniu – 25 ng/μl. Przy amplifikacji został wykorzystany termocykler T Professional Basic Gradient firmy Biometra. Warunki reakcji RAPD-PCR zamieszczono w Tabeli 2. Amplifikacja była po-

wtarzana dwukrotnie dla każdej próby, a w zestawieniu wyników umieszczono tylko powtarzalne analizy.

Elektroforezę produktów PCR w każdym przypadku przeprowadzano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem 1 μl roztworu bromku etydyny przez 2 h pod napięciem 100 V. W celu identyfikacji mas molekularnych wykorzystano marker wielkości O'RangeRuler 100 bp firmy Fermentas o zakresie

**Tabela 2** Warunki reakcji RAPD-PCR  
**Table 2** Conditions for RAPD-PCR reaction

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
Denaturacja wstępna	94	60
Denaturacja	94	30
Wiązanie starterów	35	30
Synteza	72	30
<b>Liczba cykli</b>	<b>10</b>	
Denaturacja	94	30
Wiązanie starterów	37	30
Synteza	72	60
<b>Liczba cykli</b>	<b>30</b>	
Synteza końcowa	72	180
Przechowywanie	4	∞
Wzrost temperatury	1°C/s	

identyfikacji mas molekularnych od 100 do 1500 par zasad. Rozdzielone fragmenty DNA były uwiidaczane pod światłem ultrafioletowym i rejestrowane na zdjęciach. Na podstawie analiz zdjęć określono masy molekularne produktów amplifikacji RAPD-PCR za pomocą programu *UVIBand* v. 12.14.

### 3. WYNIKI

Spośród 50 testowanych starterów oligonukleotydowych wybrano 10 dających najwięcej produktów amplifikacji (Tab. 3). Startery te analizowano dwukrotnie dla każdej z 4 metod izolacji DNA. Liczba produktów amplifikacji była zależna

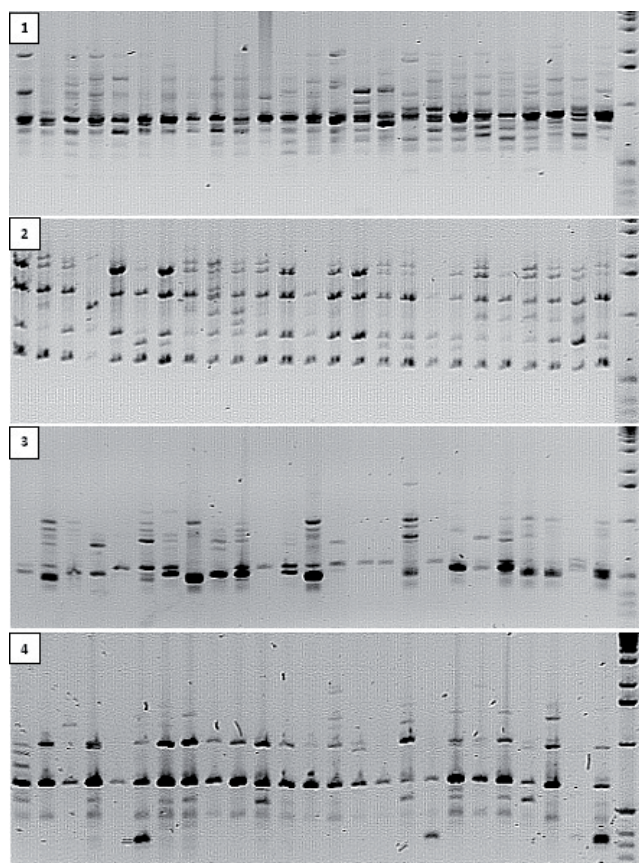
**Tabela 3** Średnia liczba produktów amplifikacji wygenerowanych przez każdy z użytych starterów w zależności od zastosowanej metody izolacji DNA

**Table 3** Mean number of amplification products generated by each of the primers used depending on the method of DNA isolation

Nr startera Primer no.	Sekwencja nukleotydowa 5'-3' starterów Sequences 5'-3' of primers	Quiagen DNeasy Plant Kit	Genomic Mini AX Plant	Maxwell® 16 LEV Plant DNA Kit	Thomson & Henry
OPA 04	AATCGGGCTG	7,1	6,2	6,4	3,2
OPA 07	GAAACGGGTG	5,2	5,3	5,2	4,7
OPA 10	GTGATCGCAG	6,5	6,1	4,8	2,5
OPA 14	TCTGTGCTGG	8,5	4,3	7,1	5,1
OPB 04	GGACTGGAGT	8,2	7,5	3,6	5,3
OPB 17	AGGGAACGAG	5,7	6,8	4,5	3,9
OPF 12	ACGGTACCAG	9,1	4,9	4,9	5,7
OPG 12	CAGCTCACGA	7,5	7,1	3,8	2,9
OPH 20	GGGAGACATC	9,3	4,5	4,0	5,0
OPJ 08	CATACCGTGG	9,6	7,5	4,5	2,6
	<b>Średnia Mean</b>	<b>7,67</b>	<b>6,02</b>	<b>4,88</b>	<b>4,09</b>



od metody izolacji DNA. Średnio największą liczbę produktów amplifikacji uzyskano przy zastosowaniu sposobu izolacji DNA metodą kolumnkową Quiagen DNeasy Plant Kit, nieco mniejszą przy użyciu kitu Genomic Mini AX Plant firmy A&A, natomiast najmniej produktów otrzymywano po wykorzystaniu zestawu Maxwell oraz metody Thomsona i Henry'ego [6]. Dodatkowo ilość uzyskanych produktów ściśle wiązała się z sekwencją starterów. Przykładowe elektroforogramy obrazujące produkty amplifikacji otrzymane po izolacji DNA różnymi metodami przedstawiono na Rysunku 1.



**Rysunek 1** Elektroforogram produktów amplifikacji DNA wykonany techniką RAPD-PCR z zastosowaniem DNA izolowanego metodą kolumnkową przy pomocy kitu Quiagen DNeasy Plant Kit (1), metodą Thomsona i Henry'ego (2), metodą kolumnkową Genomic Mini AX Plant firmy A&A Biotechnology (3), przy pomocy zestawu Maxwell (4)

**Figure 1** The electropherogram of DNA amplification products yielded by the RAPD-PCR method using DNA isolated with a Quiagen DNeasy Plant Kit (1), according to Thomson and Henry (2), using the Mini AX Plant from A&A Biotechnology (3), and using a Maxwell set (4)

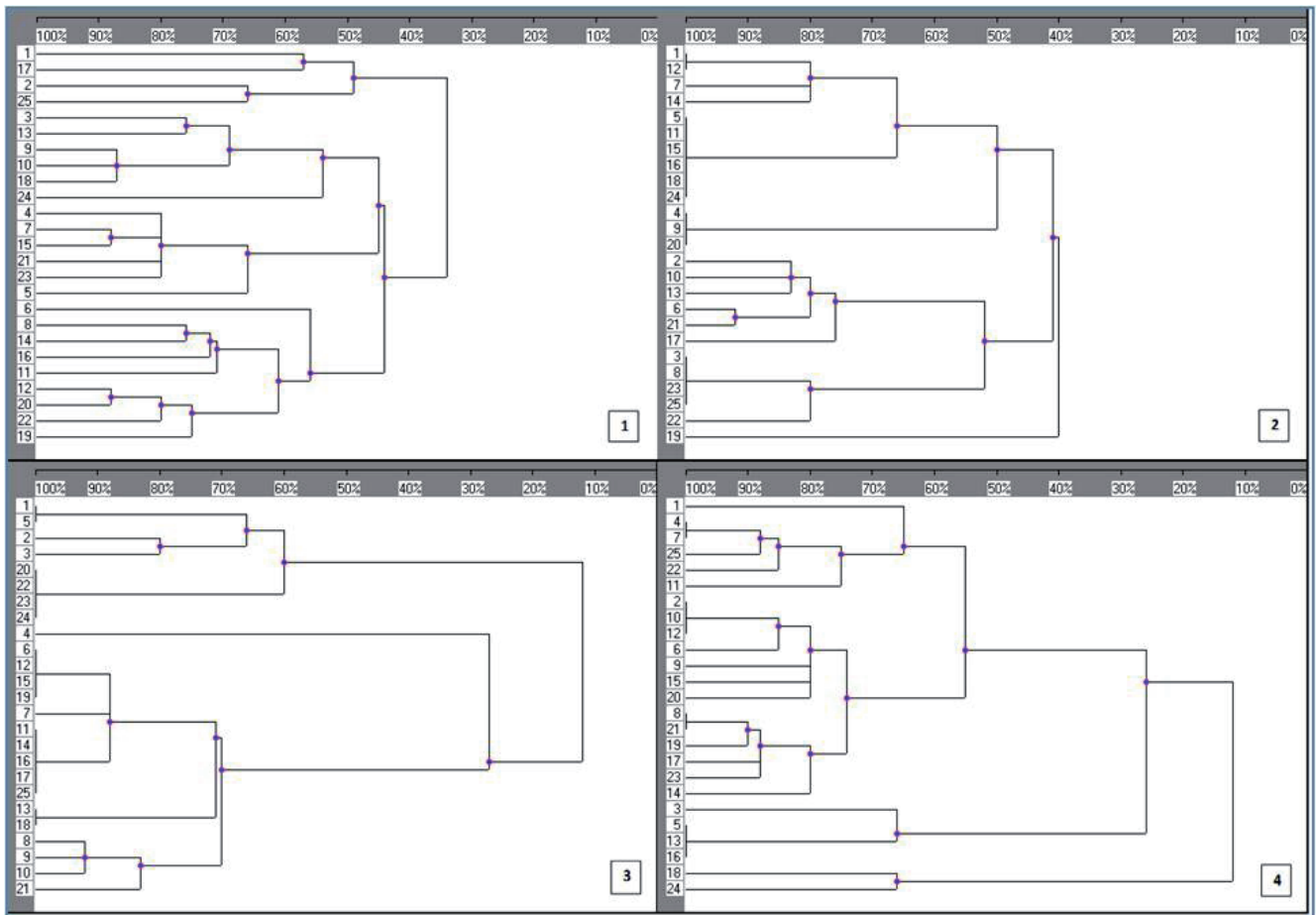
Otrzymane dendrogramy podobieństwa genetycznego linii pszenicy ozimej zależały od zastosowanej metody izolacji DNA. Przy zastosowaniu kitu Quiagen DNeasy Plant Kit podobieństwo ge-

netyczne między analizowanymi obiektami wahało się między 45% a 88%, przy metodzie Thomsona i Henry'ego [3] od 42% do 93%; przy metodzie kolumnkowej od 27% do 94%, natomiast przy pomocy zestawu Maxwell od 28% do 90% (Rys. 2). Pomimo wykorzystania identycznych starterów, metoda izolacji DNA rzutowała na ilość i skład grup podobieństwa genetycznego badanych linii pszenicy ozimej. Przy zastosowaniu kitu Quiagen DNeasy Plant Kit wyodrębnić można 2 główne grupy różnicowania genetycznego, przy czym w skład pierwszej wchodzi tylko 4 genotypy, natomiast w drugiej można wyróżnić trzy duże podgrupy obejmujące pozostałe 21 genotypów pszenicy ozimej. Po izolacji DNA metodą Thomsona i Henry'ego [6] 25 badanych genotypów utworzyło 2 różniące się grupy o podobnej liczebności, natomiast linia 19 okazała się odmienna genetycznie od pozostałych testowanych obiektów. Po zastosowaniu metody kolumnkowej na dendrogramie widoczne były dwie grupy: pierwsza złożona z 9 genotypów i druga składająca się z 15 podobnych pod względem genetycznym linii oraz różniąca się od wszystkich pozostałych linia 4. Przy zastosowaniu automatycznej izolacji DNA za pomocą zestawu Maxwell wyodrębniła się grupa złożona z dwóch genotypów (18 i 24) oraz grupa składająca się z kilku podgrup, obejmująca wszystkie pozostałe analizowane linie.

#### 4. DYSKUSJA

Problem wyboru metody izolacji DNA jest w literaturze omawiany od kilku lat. Na decyzję o wyborze konkretnej metody izolacji mają wpływ takie czynniki jak: ilość analizowanych prób, rola jakości uzyskanego DNA, koszty wykonania pojedynczej analizy oraz czas potrzebny na wykonanie izolacji. Oczywiście ciągle ulepszają się metody izolacji DNA zmierzając do uzyskania metod tanich, z których będzie pochodzić duża ilość DNA wysokiej jakości uzyskana w możliwie krótkim czasie przy małym nakładzie pracy.

Varma i wsp. [7] wymieniają jako główne czynniki wpływające na wydajność izolacji DNA źródło materiału roślinnego (typ tkanki i wiek, sposób pozyskania oraz przechowywanie) i procedurę (głównie proces homogenizacji) oraz obecność zanieczyszczeń (polisacharydów, polifenoli, białek, RNA i pozajądrowego DNA pochodzącego z chloroplastów i mitochondriów). Autorzy wskazują, że zastosowanie gotowych zestawów do izo-



**Rysunek 2** Dendrogramy podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi obiektami – analiza wykonana przy użyciu DNA izolowanego metodą kolumnkową przy pomocy kitu Quiagen DNeasy Plant Kit (1) , metodą Thomsona i Henry’ego (2), metodą kolumnkową Genomic Mini AX Plant firmy A&A Biotechnology (3), przy pomocy zestawu Maxwell (4)

**Figure 2** Dendrograms of genetic similarity between the analyzed objects – analysis performed using DNA isolated by a Quiagen DNeasy Plant Kit (1), according to Thomson and Henry (2), using the Mini AX Plant from A&A Biotechnology (3), and using a Maxwell set (4)

lacji genomowego DNA jest preferowane przez biologów molekularnych, ponieważ są one łatwe w użyciu i prowadzą do szybkiego otrzymania dobrej jakości DNA. Ponadto DNA po izolacji jest dobrze oczyszczone, gdyż zestawy zawierają bufora lityczne, RNAzę, a białka i polisacharydy są usuwane przez precypitację i wirowanie. Wybór metody izolacji DNA powinien uwzględniać wielkość badanej populacji, czas izolacji, stopień skomplikowania procedury i przeznaczenie izolatu DNA [8].

Spośród wielu dostępnych metod izolacji DNA niektóre cieszą się dużą popularnością. Należą do nich między innymi: Murray i Thompson [9], Doyle i Doyle [10], Rogers i Bendich [11], Lodhi i wsp. [12]. Niestety żadna z tych metod nie jest uniwersalna i nie może zostać zastosowana do wszystkich gatunków roślin [7]. Wiąże się to między innymi z obecnością ściany komórkowej, barwników, różnorodnych metabolitów wtórnych. Czę-

sto inne metody izolacji wykonuje się dla roślin jednoliściennych i dwuliściennych. Williams i Ronald [13] opisują metodę izolacji DNA z liści bez konieczności homogenizacji tkanek – metodę pomocną w sytuacji, gdy liście danego gatunku są włókniste, a homogenizacja bardzo pracochłonna. Zhang i wsp. [14] zaproponowali metodę ekstrakcji DNA opartą na recyklingu. Podstawowym założeniem tej metody jest to, że pojedyncza próbka tkanki roślinnej zwraca do ekstrakcji DNA do czterech razy i odpowiednio 4 razy następuje wytrącanie DNA. Metodę tę zastosowano do takich gatunków jak pszenica, sorgo, jęczmień, kukurydza i ryż, a w rezultacie uzyskano wysokiej wydajności i dobrej jakości próbki DNA.

Zestawy do izolacji DNA dostępne są przez takie firmy jak: Quiagen, Promega, Epibio, Cartagen, Roche. W zestawie Maxwell firmy Promega specjalnie dobrany skład buforów wiążących i płuczających pozwala uzyskać DNA o bardzo wysokiej

jakości i czystości. Izolowany DNA nie ulega fragmentacji w trakcie procesu oczyszczania. Metoda jest bardzo efektywna, nawet w przypadku izolacji z niewielkiej ilości tkanki. Brak inhibitorów reakcji następczych pozwala na bezpośrednie zastosowanie oczyszczonych kwasów nukleinowych w innych technikach biologii molekularnej, takich jak: sekwencjonowanie DNA (zautomatyzowane i manualne), defosforylacja, fosforylacja, ligacja, badanie oddziaływań DNA-białko, trawienie enzymami restrykcyjnymi. Złoża magnetyczne, w odróżnieniu od standardowych złożów stosowanych do izolacji i oczyszczania DNA, umożliwiają pełną automatyzację tego procesu. Procedura nie wymaga użycia specjalistycznego sprzętu, takiego jak wirówka lub pompa próżniowa.

Przy zastosowaniu zestawów do izolacji czysty DNA może być uzyskany w przybliżeniu w ciągu godziny, jednak większość z tych produktów jest stosunkowo droga. Wysokie koszty komercyjnych zestawów do izolacji DNA bądź stosunkowo mała ilość uzyskiwanego DNA sprawiają, że poszukuje się możliwości zoptymalizowania metody izolacji DNA roślinnego. Zastosowana przez Pietrusińską i Czembora [8] izolacja genomowego DNA (kit Quiagen i szybka metoda NaOH) nie powodowała degradacji kwasu nukleinowego pod wpływem temperatury, a liczba otrzymanych produktów reakcji PCR była taka sama. Ponadto intensywność produktów reakcji (prążków) była bardzo wysoka. Xin i Chen [1] w swojej pracy analizowali metodę izolacji DNA będącą połączeniem metody CTAB z MagAttract Kit. Uzyskali DNA w dużej ilości i wysokiej jakości dla takich gatunków jak sorgo, pszenica, kukurydza czy bawełna. Dodatkowym atutem tej modyfikacji była duża ilość izolacji wykonanych przez jedną osobę – autorzy zapewniali, że w ciągu jednego dnia pojedynczy pracownik wykona dwie płytki na 96 próbek każda.

Dobrzycka i Broda [15] wykazali, że stężenie DNA otrzymanego po izolacji metodą Thomsona-Henry'ego wynosiło od 2147  $\mu\text{g/ml}$  do 2513  $\mu\text{g/ml}$ , a w przypadku DNA izolowanego metodą kolumnkową za pomocą Quiagen DNeasy Plant Kit stężenie DNA wynosiło od 2492  $\mu\text{g/ml}$  do 3465  $\mu\text{g/ml}$ . Tamari i wsp. [2] zaobserwowali, że średnia koncentracja DNA po izolacji zależała od zastosowanej metody i była wyższa dla metody Edwardsa (od 300,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  do 1558,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) niż dla powszechnie stosowanej metody CTAB, w której zawartość DNA wynosiła od 341,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  do 897,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . W omawianej pracy ilość otrzymane-

go DNA zależała od metody izolacji i była najwyższa dla zestawu Quiagen DNeasy Plant Kit, a najniższa dla metody Thomsona i Henry'ego [6]. Ponadto Tamari i wsp. [2] wskazują na to, że izolacja DNA z tkanek generatywnych lub aktywnych mitotycznie podnosi wydajność procesu, ponieważ tkanki te zawierają wyższą ilość genomowego DNA, a najwyższą efektywność izolacji DNA wykazały pąki kwiatowe cztery dni przed pyleniem. Najczęściej napotykanym problemem przy posługiwaniu się techniką RAPD-PCR jest niska powtarzalność wyników. Obecnie powszechnie uznaje się, że w celu uzyskania powtarzalnych zespołów profili na żelu niezbędne jest utrzymanie niezmiennych warunków reakcji [16]. Liczne badania wykazały, że ilość i powtarzalność produktów otrzymanych w technice RAPD-PCR zależy od stężenia chlorków magnezu, Taq polimerazy, koncentracji DNA czy metody izolacji DNA [17-21]. Dobrzycka i Broda [15] wykazali, że liczba produktów otrzymanych w wyniku reakcji RAPD-PCR była zależna od metody izolacji DNA – zastosowanie Quiagen DNeasy Plant Kit spowodowało prawie dwukrotnie wyższą liczbę prążków niż po izolacji metodą Thomsona i Henry'ego [6] oraz wpływała na obraz produktów otrzymanych po analizie RAPD-PCR i wynik analizy podobieństwa genetycznego lucerny przedstawiony na dendrogramach. Starke i wsp. [22] wskazują, że na wyniki pirosekwencjonowania mają wpływ metoda izolacji DNA i wybór startera. Potwierdzają to otrzymane wyniki – najwyższy polimorfizm produktów reakcji PCR otrzymano po izolacji genomowego DNA pszenicy ozimej za pomocą zestawu Quiagen DNeasy Plant Kit i startera OPJ 08. Celem badań przeprowadzonych przez Gurudeeban i wsp. [23] było zminimalizowanie i uproszczenie procedury izolacji DNA do oceny różnorodności genetycznej wśród roślin *Suaeda* sp. przy użyciu markerów RAPD-PCR. Rośliny te zawierają wyjątkowo duże ilości polifenoli, garbników i metabolitów wtórnych, takich jak alkaloidy, flawonoidy i fenole, które mogłyby zakłócać procedury izolacji DNA. Autorzy modyfikując metody ekstrakcji uzyskali od 2 do 12 produktów reakcji w zależności od wykorzystanego startera.

## 5. PODSUMOWANIE

Ze względu na jakość otrzymanych obrazów elektroforetycznych najlepszą metodą izolacji DNA była metoda izolacji kitem Genomic Mini AX



Plant. Metodą szybką i tanią jest metoda Thom-sona i Henry'ego, natomiast metodą o największym zróżnicowaniu ilości otrzymanego DNA była izolacja z wykorzystaniem zestawu Maxwell. Jakość DNA otrzymanego po izolacji za pomocą Quiagen DNeasy Plant Kit była najwyższa, jak

również otrzymano po tej metodzie izolacji najwyższej jakości elektroforogramy z jednocześnie najwyższą ilością otrzymanych produktów. Jest to jednak metoda izolacji DNA najdłuższa i najdroższa, co ogranicza jej wykorzystanie przy dużej liczbie badanych genotypów.

## LITERATURA

- [1] Xin Z., Chen J. A., High throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods* 8, 2012, 26.
- [2] Tamari F., Hinkley C. S., Ramprashad N. A Comparison of DNA Extraction Methods using *Petunia hybrid* Tissues. *Journal of Biomolecular Techniques* 24, 2013, 113-118.
- [3] Myśków B., Milczarski P., Masojć P. Comparison of RAPD, ISSR and SSR markers in assessing genetic diversity among rye (*Secale cereal*) inbred lines. *Plant Breeding and Seed Science* 62, 2010, 107-115.
- [4] Jiang P. Molecular tools for Nursery Plant Production. *Adv. Crop Sci. Tech.* 2:4, 2014, 146-148.
- [5] Jonah P. M., Bello L.L., Lucky O., Midau A., Morrappa S. M. Review: The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research* 11, 5, 2011, 5-12.
- [6] Thompson D., Henry R. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19, 1995, 394-400.
- [7] Varma A., Padh H., Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnol. J.* 2, 2007, 386-392.
- [8] Pietrusińska A., Czembor P. Cz. Ocena wybranych metod izolacji DNA pod względem ich przydatności w hodowli pszenicy. *Biuletyn IHAR* 244, 2007, 59-68.
- [9] Murray M. G. and Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 19, 1980, 4321-4326.
- [10] Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 1987, 11-15.
- [11] Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* 5, 1985, 69-76.
- [12] Lodhi M. A., Ye G.-N., Weeden N. F. and Reisch B. I. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1), 1994, 6-13.
- [13] Williams, C. E. and Ronald P. C. PCR template-DNA isolated quickly from monocot and dicot leaves without tissue homogenization. *Nucleic Acids Research* 22, 10, 1994, 1917-1918.
- [14] Zhang L., Wang B., Pan L., Peng J. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics* 40, 2013, 45-54.
- [15] Dobrzycka A., Broda Z. Wpływ metody izolacji DNA na wynik analizy podobieństwa genetycznego wykonanej techniką RAPD. *Biotechnologia* 3, 86, 2009, 182-191.
- [16] Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A. and Karp A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3, 1997, 381-390.

- [17] Devos K. M. and Gale M. D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84, 1992, 567-572.
- [18] He Q., Viljanen M. K., Mertsola J. Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Mol. Cell. Probes* 8(2), 1994, 155-159.
- [19] MacPherson J. M., Eckstein P. E., Scoles G. J., Gajadhar A. A. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol. and Cell. Probes* 7, 4, 1993, 293-299.
- [20] Meunier J.-R., Grimont P. A. D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* 144, 5, 1993, 373-379.
- [21] Yu K., Pauls K. P. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Research* 20, 10, 1992, 2606.
- [22] Starke I. C., Vahjen W., Pieper R., Zentek J. The influence of DNA Extraction Procedure and Primer Set on the Bacterial Community Analysis by Pyrosequencing of Barcoded 16S rRNA Gene Amplicons. *Molecular Biology International* Vol. 2014, 2014, 1-10.
- [23] Gurudeeban S., Ramanathan T., Satyavani K. and Dhinesh T. Standardization of DNA Isolation and PCR Protocol for RAPD Analysis of *Suaeda* sp. *Asian Journal of Biotechnology* 3(5), 2011, 486-492.