

Секция «Молекулярная и клеточная биоинженерия и биоинформатика»

Новый подход к решению проблемы амплификации почвенной ДНК

Научный руководитель – Матвеева Татьяна Валерьевна

Владимиров Иван Артемьевич

Аспирант

Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: ivanpentod@gmail.com

Серьезной проблемой при работе с почвенной ДНК является наличие примеси гуминовых кислот, эффективно ингибирующих ПЦР. Гуматы обладают сходными с ДНК физико-химическими свойствами, и образуют с последней прочные комплексы, что сильно осложняет как процедуры очистки ДНК, так и постановку реакций с её участием.

Часто применяемое для решения проблемы разбавление ДНК снижает количество гуматов до приемлемого для ПЦР уровня, однако приводит к потере редких фрагментов. Происходит искажение результатов. Например, при изучении почвенного биоразнообразия по сиквенсам 16S рДНК разбавление ДНК будет приводить к кажущемуся снижению биоразнообразия из-за выпадения редких таксонов

Нами предложен альтернативный путь, в перспективе позволяющий избежать вышеописанных проблем. Идея заключается в неспецифической преамплификации почвенной ДНК с помощью полимераз с замещающей (strand-displacement) активностью. На основе этих полимераз (*Bst*, *Phi29*) разработаны методы неспецифической репликации геномной ДНК [1]. Особенностью этих полимераз также является высокая стойкость к ингибиторам. При постановке такой реакции на почвенной ДНК фактически произойдет избирательное разбавление ДНК по гуминовым кислотам, так как последние окажутся разбавлены реакционной смесью, а концентрация ДНК будет восстановлена реакцией.

Для проверки идеи нами была проведена амплификация почвенной ДНК с разными степенями разбавления с помощью полимеразы *Bst* по методу [1]. Соотношение концентраций 16S рДНК до и после реакции оценивали с помощью ПЦР-РВ. Общая концентрация ДНК до и после преамплификации оценили с помощью электрофореза.

В итоге, нами получены следующие данные. Реакция с *Bst* действительно проходит на неразбавленной почвенной ДНК (концентрация гуматов в нейтакова, что обычная ПЦР-реакция с ней невозможна).

К сожалению, рост концентрации ДНК после реакции (в некоторых образцах - десятикратный) не сопровождался соответствующим ростом концентрации 16S рДНК, кроме того, зафиксировано увеличение молекулярной массы ДНК после реакции. Скорее всего, проблема связана с избирательной репликацией длинных (>50 т.п.н) и кольцевых молекул, на которых неспецифическая полногеномная амплификация идет эффективнее, чем на преобладающих в почвенной ДНК коротких (15-30 т.п.н.) линейных фрагментах.

При условии решения вышеуказанной проблемы с избирательностью амплификации можно получить хороший метод амплификации загрязненной гуматами ДНК.

Работа выполнена при поддержке грантов СПбГУ 1.39.315.2014 и 0.37.526.2013, РФФИ 14-04-01480а, гранта РНФ 16-16-10010.

Источники и литература

- 1) Kumar G et al. (2008). Improved multiple displacement amplification with phi29 DNA polymerase for genotyping of single human cells. *Biotechniques* 44 (7): 879–90.