

ПРАКТИЧЕСКИЙ ОПЫТ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОМОВ КОРОТКИМИ РИДАМИ

А.Б. Шевцов, Н.С. Ержанова, А.О. Амиргазин, Н.Е. Тұрсұнбай

Национальный центр биотехнологии

Республика Казахстан, 010000, г. Астана, Кургалжинской шоссе 13/5

e-mail: shevtsov@biocenter.kz

Хлоропласты (пластиды) представляют собой растительные органеллы с автономной кольцевой молекулой ДНК размером от 72 до 217 тысяч пар нуклеотидов, кодирующей около 130 генов вовлеченных в фотосинтез. Хотя геномы хлоропластов содержат высококонсервативные гены, необходимые для роста и развития растений, они также содержат вариабельные области, т.е. межгенные области и структурные вариации внутри генов, что отражает важную эволюционную информацию растений. Полные последовательности генома хлоропластов могут быть использованы для эволюционных исследований внутри и между различными группами растений.

Для полногеномного секвенирования хлоропластных геномов (хпДНК) применяется две стратегии: амплификация всего генома хлоропластов из тотальной ДНК с использованием длинной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и прямое выделение хпДНК из свежего растительного материала с последующим секвенированием с использованием высокопропускных секвенаторов. В последнем случае качество и чистота выделенной хлоропластной ДНК напрямую влияет на полученный результат. Предложен ряд методов для отделения хлоропластов

и выделения ДНК. Некоторые методы, такие как центрифугирование хлоропластов в градиенте с сахарозой требуют наличия дорогостоящего оборудования, а методы основанные на применении ДНКаз не всегда эффективны. На наш взгляд, осаждение хлоропластов в растворах с повышенной ионной силой позволяет получить достаточно очищенные препараты хлоропластной ДНК пригодные для секвенирования на NGS платформах. Детальный протокол описан в работе Shi C. с соавторами (2012).

За период 2023 года сотрудниками Национального центра биотехнологии было проведено выделение хпДНК из листьев 71 одного вида растений. Концентрация ДНК в 1 мкл раствора варьировала от 2,4 до 32,1 нг, что достаточно для секвенирования на MiSeq (Illumina).

Секвенирование 14 образцов позволило получить от 1,2 до 2 млн. ридов на образец. Картирование ридов на собранный хлоропластный геном показывает целевое секвенирование на уровне 50-86%.

Применяемая технология может быть использована для изучения и подтверждения таксономического статуса высших сосудистых растений Казахстана.