

УДК 634.8 + 631.52 + 581.167

UDC 634.8 + 631.52 + 581.167

**ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ПРИ ПОМОЩИ
PEQGOLD PLANT DNA MINI KIT****EXTRACTING DNA WITH USING PEQGOLD
PLANT DNA MINI KIT**Милованов Александр Валериевич
учебный мастерMilovanov Alexander Valerievich
training masterТрошин Леонид Петрович
д.б.н., профессор
Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, РоссияTroshin Leonid Petrovich
Dr.Sci.Biol., professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

В представленной статье освещена новая методика выделения ДНК из свежих и гербарных листьев винограда с целью последующего их секвенирования

In the present article, the new method of DNA extraction from fresh and herbarium leafs of grape to their subsequent sequencing was described

Ключевые слова: ВИНОГРАД, СОРТ,
ПРИЗНАКИ, ЛИСТ, ДНК, СЕКВЕНИРОВАНИЕKeywords: GRAPE, KIND, TRAITS, LEAF, DNA,
SEQUENCE

Введение

Биологический гигант растительного царства вид *Vitis vinifera* L., как совокупность евразийских сортов винограда, повсеместно является лидирующим объектом масштабных генетических исследований, что связано с его широким распространением в мире и большой значимостью как сельскохозяйственной культуры. Этот вид растения активно используется для создания генетических карт, генетической трансформации и создания ДНК-паспортов. Относительно небольшой геном *V. vinifera* L., сравнительно с большинством других многолетних культур, усложняет процедуру генетических исследований винограда.

Выделение ДНК из винограда, в целом, представляется весьма трудным делом в связи с присутствующими загрязнителями, такими как полифенолы и полисахариды. Эти компоненты также являются причиной сложности очистки ДНК в других видах растений: помимо полисахаридов, полифенолов и смоловые соединения. Присутствие таких загрязнителей в растворах ДНК делают их вязкими и создают помехи при рестрикции ДНК, а также делают ее неподходящей для амплификации в ПЦР.

Существующие протоколы выделения ДНК часто дают недостаточное количество выделенной ДНК или же неподходящего качества [1].

Материал и методы исследований

Евразийский виноград *Vitis vinifera* L. – широко возделываемая и экономически важная культура в мире. Для его исследований необходимо подключать на молекулярно-генетическом уровне новые методы анализа. Для них необходимо найти простые и удобные способы выделения ДНК из разнообразных источников. Сложным материалом для экстрагирования ДНК из винограда являются вызревшие и гербарные листья. Гербарные образцы, заготовленные длительное время назад, требуют определенной степени подготовки. Наличие гербарных коллекций делает их потенциально важным источником материала для филогенетических исследований. Конечно, свежие или замороженные растительные образцы лучше подходят, так как содержат большее количество ДНК, однако появляется возможность выделить и проанализировать растения возрастом более чем 100 лет и которые, возможно, уже нельзя встретить в природе [2].

Выделение ДНК - основополагающий шаг в исследовании генома и в техниках картирования с использованием молекулярных маркёров, а также для идентификации и изоляции генов растений с целью использования их в генной инженерии.

Большинство простых и быстрых процедур выделения, дающих достаточное количество ДНК, уже было описано. Каждый из них ориентирован на получение хороших результатов для конкретного вида анализа, таких как RAPD, RFLP или SSR, также известных как микросателлиты. Тем временем, генетические исследования винограда

направлены сейчас на идентификацию сортов, анализ происхождения и генетического сходства [3].

Результаты НИР

Развитие наборов для выделения ДНК из животных и растительных тканей получили широкое распространение среди исследователей. Эти наборы имеют значительное преимущество меньшим количеством используемых химикатов, коротким протоколом выделения и более быстрым достижением результатов. Как и ранее, эти наборы имеют такие недостатки как высокая стоимость, непостоянность количества выделенной ДНК и её качества, заявленных производителем, и, как следствие, ДНК не является достаточно качественным к использованию в биотехнологии [4].

Следует отметить, что использование некоторых наборов позволяет вторично применять лабораторный пластик, что, в свою очередь, позволяет сократить денежные затраты [5].

Большинство из существующих методов являются зачастую не только долгими, но и опасными, вследствие применяемых для выделения ДНК токсичных веществ. В данной обзорной статье описывается безопасный, быстрый и достаточно эффективный универсальный метод выделения ДНК из свежих и засушенных листьев винограда при помощи reqGOLD Plant DNA Mini Kit.

Протокол выделения позволяет осуществлять одновременное выделение 24 образцов ДНК.

Подготовку к выделению проводили путем помещения апикальных листьев в пробирки на 2 мл, туда же клались два металлических шарика, и наполнялись 2 сосуда с жидким азотом. Перед размельчением пробирки с листьями и шариками помещались в сосуд № 1 (рис. 1).



Рис. 1. Сосуды с жидким азотом, использованные в работе.

Листья растирались в пробирке в жидком азоте при помощи лопаточки, которая очищалась от остатков листьев и промывалась между растираниями изопропанолом и охлаждалась в жидком азоте. Далее пробирки с растертыми листьями помещались в жидкий азот сосуда № 2.

Потом в холодильнике, который поддерживает постоянно -70°C доставались адаптеры для шейкера. Пробирки с растертыми в жидком азоте листьями и 2 металлическими шариками помещались в 2 адаптера (в каждый по 12 шт., так как метод позволяет одновременно выделять 24 образца) и дважды размельчались по 30 секунд (рис. 2).

Далее пробирки помещались на лёд. После чего приступали собственно к выделению.

Протокол выделения.

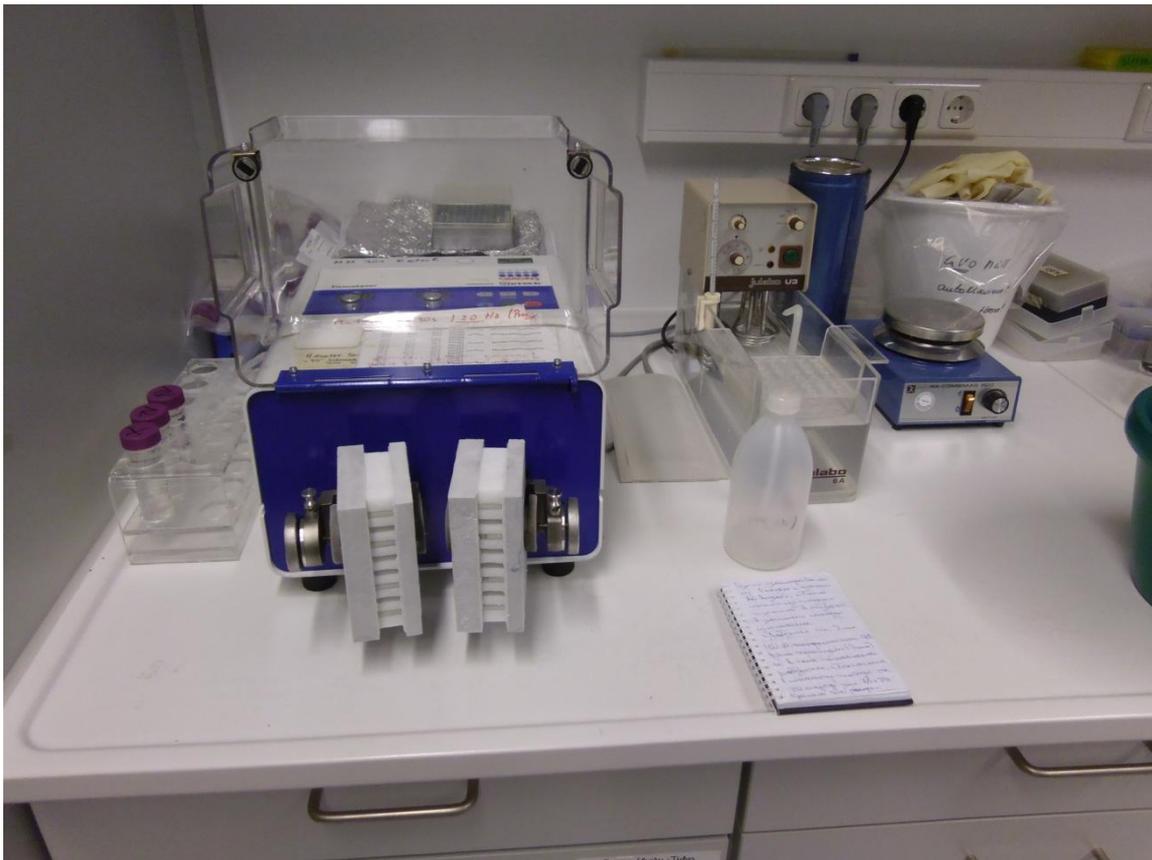


Рис. 2. Шейкер с адаптерами, подготовленный к работе.

1. В пробирке на 15 мл смешивали 10 мл Lysebuffer PL1 и 375 мкл РНКазы.
2. В каждую пробирку приливали 415 мкл смеси и перемешивали 10 секунд на Vortex, переворачивая пробирку, затем, чтобы прилипшие к стенкам и крышке пробирке листья попали в раствор и перемешались.
3. Далее пробирки инкубировались 30 минут на шейкере при 65 °С, 850 rpm.
4. Пока пробирки инкубируются на шейкере, в подставку выставляются 48 белых пробирок из набора. В верхние 24 выставляются желтые пробирки с фильтрами, а в нижние 24 соответственно синие пробирки с фильтрами. Для ускорения процесса также в подставку выставляются 24 обычные пробирки на 1,5 мл.

5. После окончания инкубации в пробирки с ДНК добавляется 100 мкл Lysisbuffer PL2 и всё снова перемешивается на Vortex. Далее пробирки помещаются на лед на 15 минут (для достижения лучшего результата лучше поместить на более долгий срок содержания, на 30, 40 минут или на 1 час).

6. После инкубирования на льду пробирки центрифугируются 5 минут при скорости 15.000 g.

7. Получившийся супернатант переместить в желтые пробирки с фильтрами: по объему супернатанта получается примерно 390-420 мкл (рис. 3).

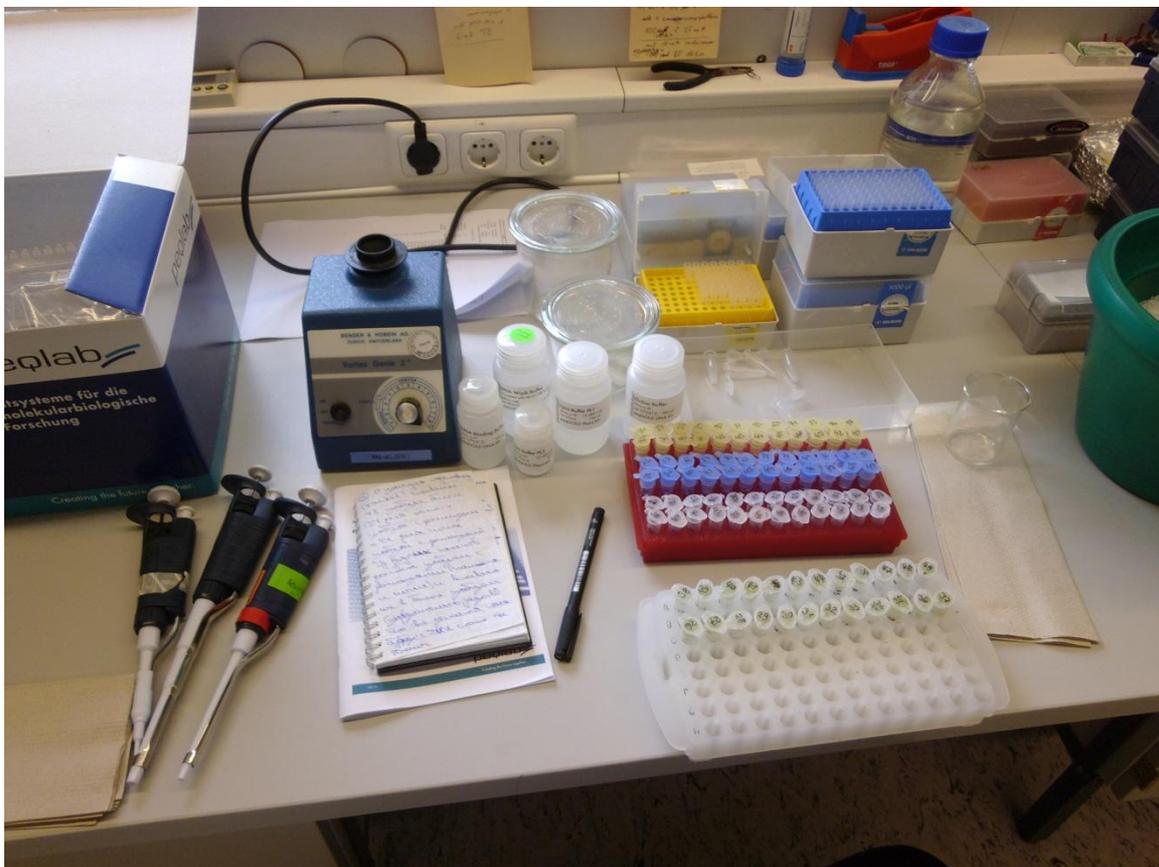


Рис. 3. Рабочее место. Этап перед внесением супернатанта в желтые пробирки.

8. Процентрифугировать 1 минуту на 10.000 g.

9. Далее желтые пробирки выбрасываются и в белые пробирки под ними, к уже имеющейся профильтрованной жидкости, приливается 200 мкл Bindingbuffer и пипетируется для лучшего образования смеси, при

этом следует стараться пипетировать так, чтобы в наконечнике не образовывались пузырьки (это уменьшает повреждения ДНК).

10. Полученную смесь перенести в синие пробирки с фильтрами.

11. Процентрифугировать на 10.000 g 1 минуту. После центрифугирования следует проверить синие пробирки на свету. Если в них что-то осталось, следует повторить центрифугирование до полного удаления жидкости.

12. Из белых пробирок снизу выливается жидкость, они протираются о лабораторную бумагу и в них снова вставляются синие пробирки с фильтрами.

13. В синие пробирки с фильтрами прилить 650 мкл Washbuffer и центрифугировать на 10.000 g 1 минуту.

14. После центрифугирования вылить из белых пробирок жидкость и повторить промывание при помощи 650 мкл Washbuffer.

15. Когда второй раз удалим жидкость из белых пробирок, процентрифугировать «пустые» пробирки 2 минуты при 10.000 g.

16. Во время центрифугирования в 4 пробирки на 1,5 мл налить 1,5 мкл Elutionbuffer и поставить их нагреваться на 65 °С для лучшего осаждения ДНК.

17. После центрифугирования синие пробирки с фильтрами вставить в пробирки на 1,5 мл и открыть для просушки на 5 минут.

18. Далее в синие пробирки с фильтрами прилить 100 мкл Elutionbuffer и оставить стоять на 15 минут (для достижения лучшего результата можно удлинить время до 40 минут или же 1 часа).

19. Центрифугировать 3 мин на 6.000 g.

20. Снова приливаем 100 мкл Elutionbuffer в синие пробирки и также центрифугируем 3 мин на 6.000 g [6].

В итоге, в нижней белой пробирке на 1,5 мл мы получаем 200 мкл ДНК, растворённой в Elutionbuffer. После чего определяется концентрация

ДНК при помощи спектрофотометра IMPLEN и разбавляется до получения нужной для прохождения ПЦР-реакции концентрации (рис. 4).



Рис. 4. Определение концентрации ДНК при помощи спектрофотометра IMPLEN.

Таким образом, данный метод позволяет выделять по 24 образца в день. Количество и качество ДНК пригодны для проведения ПЦР-анализа.

Выводы

Следует также отметить, что для подобного протокола отлично подходят гербарные листья, высушенные с использованием силики. Меньше ДНК выделилось при использовании свежих замороженных листьев, сохраненных при -70°C . Ещё меньше ДНК выделилось из также замороженных, но поврежденных старением листьев. Несмотря на этот факт, ДНК из них была использована для проведения ПЦР. Количество продукта реакции такой ДНК было сниженным, но удовлетворительным

для распознавания на секвенаторе Applied Biosystems 3130 x 1 Genetic Analyzer.

Список использованной литературы

1. Muhammad A. Lodhi, Guang-Ning Ye, Norman F. Weeden and Bruce I. Reisch. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and Vitis Species // Department of Horticultural Sciences. - New York State Agricultural Experiment Station: Cornell University, Geneva, NY 14456, USA. – 1994. – P. 6-13.
2. Звягин А.С. Выделение ДНК из гербарных листьев *Vitis vinifera* L. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2010. – № 04 (058). С. 336–347. – Шифр Информрегистра: 0421000012\0081, IDA [article ID]: 0581004022. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2010/04/pdf/22.pdf>, 0,75 у.п.л., импакт-фактор РИНЦ=0,577.
3. Labra M., Carreno-Sanchez E., Bardini M., Basso B., Sala F. and Scienza A. Extraction and purification of DNA from grapevine leaves. - Dipartimento di Biologia: Milano / Italia. – 2001. – 2.
4. Akkurt M. Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). - Department of Horticulture: Ankara University, Ankara / Turkey.
5. Lemke L., Rex M., Zyprian E. and Töpfer R. A simple, inexpensive and environmentally friendly method for high throughput DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.) // Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants (Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof). – Siebeldingen / Germany. – 2011. – 4.
6. Web-site <http://www.peqlab.co.uk/wcms/uk/products/index.php?do=getArticleDetails&which=12-3486-01>

References

1. Muhammad A. Lodhi, Guang-Ning Ye, Norman F. Weeden and Bruce I. Reisch. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and Vitis Species // Department of Horticultural Sciences. - New York State Agricultural Experiment Station: Cornell University, Geneva, NY 14456, USA. – 1994. – P. 6-13.
 2. Zvjagin A.S. Vydelenie DNK iz gerbarnyh list'ev *Vitis vinifera* L. // Politematicheskij setevoy jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [Jelektronnyj resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2010. – № 04 (058). S. 336–347. – Shifr Informregistra: 0421000012\0081, IDA [article ID]: 0581004022. – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2010/04/pdf/22.pdf>, 0,75 u.p.l., impakt-faktor RINC=0,577.
 3. Labra M., Carreno-Sanchez E., Bardini M., Basso B., Sala F. and Scienza A. Extraction and purification of DNA from grapevine leaves. - Dipartimento di Biologia: Milano / Italia. – 2001. – 2.
 4. Akkurt M. Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). - Department of Horticulture: Ankara University, Ankara / Turkey.
 5. Lemke L., Rex M., Zyprian E. and Töpfer R. A simple, inexpensive and environmentally friendly method for high throughput DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.) // Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants (Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof). – Siebeldingen / Germany. – 2011. – 4.
- <http://ej.kubagro.ru/2013/06/pdf/11.pdf>

Grapevine Breeding Geilweilerhof). – Siebeldingen / Germany. – 2011. – 4.
6. Web-site <http://www.peqlab.co.uk/wcms/uk/products/index.php?do=getArticleDetails&which=12-3486-01>