

УДК 634.8 + 631.52 + 581.167

UDC 634.8 + 631.52 + 581.167

**ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК МЕТОДОМ
NUCLEOSPINPLANT 2 COREKIT.
КОММЕНТАРИИ****EXTRACTING DNA BY NUCLEOSPINPLANT 2
COREKIT. COMMENTS**Милованов Александр Валериевич
аспирантMilovanov Alexander Valerievich
postgraduate studentТрошин Леонид Петрович
д.б.н., профессор
Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, РоссияTroshin Leonid Petrovich
Dr.Sci.Biol., professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, RussiaВ данной обзорной статье освещается новая
методика выделения ДНК из гербарных листьев
винограда для использования их в ПЦР-анализеThis review article highlights a new method of DNA
extraction from herbarium leaves of grapes for use in
PCR-analysisКлючевые слова: ВИНОГРАД, СОРТ,
ПРИЗНАКИ, ЛИСТ, ДНК, ПЦР-АНАЛИЗKeywords: GRAPE, KIND, TRAITS, LEAF, DNA,
PCR-ANALYSIS**Введение**

Биологический вид *Vitis vinifera* L. - один из лидирующих объектов масштабных генетических исследований, что связано с его широким распространением в мире и неоспоримой важностью как сельскохозяйственной культуры. Данный вид растения активно используется для создания ДНК-паспортов, генетических карт и трансформации. Сравнительно с большинством других многолетних культур, маленький размер генома *V. vinifera* L. усложняет процедуру генетических исследований.

Выделение ДНК из винограда является весьма трудным делом из-за присутствующих загрязнителей, таких как полифенолы и полисахариды. Эти компоненты сильно осложняют очистку ДНК. Наличие таких загрязнителей в растворах ДНК делают их вязкими и создают помехи, также делают ДНК неподходящей для амплификации. Существующие методы выделения нуклеиновых кислот часто дают недостаточное количество ДНК или же низкого качества [5].

Сейчас же речь идет не только о качестве получаемого материала, но и о скорости, с какой мы его получаем. Это не менее важно в

современных условиях неформальных соревнований между научно-исследовательскими институтами.

Материал и методы исследований

Материалом исследований были гербарные листья вида *Vitis vinifera* L.

Vitis vinifera L. – практически повсеместно выращиваемая и экономически важная культура в мире. Для его исследований необходимо использовать новые методы анализа на молекулярно-генетическом уровне. Для этого необходимо искать простые, быстрые и удобные методы выделения ДНК. Не простым материалом для экстракции ДНК являются вызревшие и гербарные листья винограда. Образцы, заготовленные большое время назад, требуют определенной степени подготовки. Наличие гербарных коллекций делает их отличным 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, может быть, уже нельзя встретить в природе [1].

Выделение ДНК – это базис в исследовании генома при помощи молекулярных маркёров, а также для обнаружения и изоляции генов растений с целью использования их в генной инженерии.

Большое количество простых и быстрых процедур выделения, дающих достаточное количество ДНК, было описано и до этого. Каждый из них направлен на получение хороших результатов для конкретного вида анализа, таких как RAPD, RFLP или SSR. Тем временем, генетические исследования виноградной лозы направлены сейчас на идентификацию сортов, анализ происхождения и генетического сходства [3].

Результаты НИР

Развитие наборов образцов для выделения ДНК из растительных и животных тканей получили довольно широкое распространение. Такие наборы образцов имеют значительное преимущество меньшим количеством используемых химикатов, быстрым протоколом выделения и достижением результатов. Как и раньше, эти наборы имеют такие недостатки как высокая стоимость, непостоянство количества выделенной ДНК, её качеством, и, как следствие, ДНК не является достаточно качественным к использованию для нужд биотехнологии [2].

Стоит сказать, что применение на практике некоторых наборов позволяет вторично использовать лабораторный пластик, что позволяет сократить денежные затраты [4].

В данной статье описывается безопасный и чистый метод выделения ДНК при помощи NUCLEOSPINPLANT 2 COREKIT. Такой протокол позволяет одновременно выделять по 192 образца за 2,5-3 часа, если работать не спеша, и не напрягаясь. Для выделения использовали листья, высушенные двумя методами (обычной сушкой при +37 С⁰ и при помощи лиофильной сушки).

Подготовку листьев к выделению проводили при помощи помещения высушенных листьев в две 96-ти канальные плашки для образцов.

Сразу следует сказать, что материал для выделения ДНК был достаточно разнообразный в плане качества, фотографии его приводятся ниже (рис. 1-9).

Далее приводится протокол выделения [6].

1. В 96-ти канальную плашку поместить по 1 шарик и в каждую пробирку по небольшой части листа. По размеру достаточно всего половину ногтя большого пальца. Как было отмечено во время работы, что это оптимальное количество, так как если взять больше, то выделение будет проходить не так хорошо.

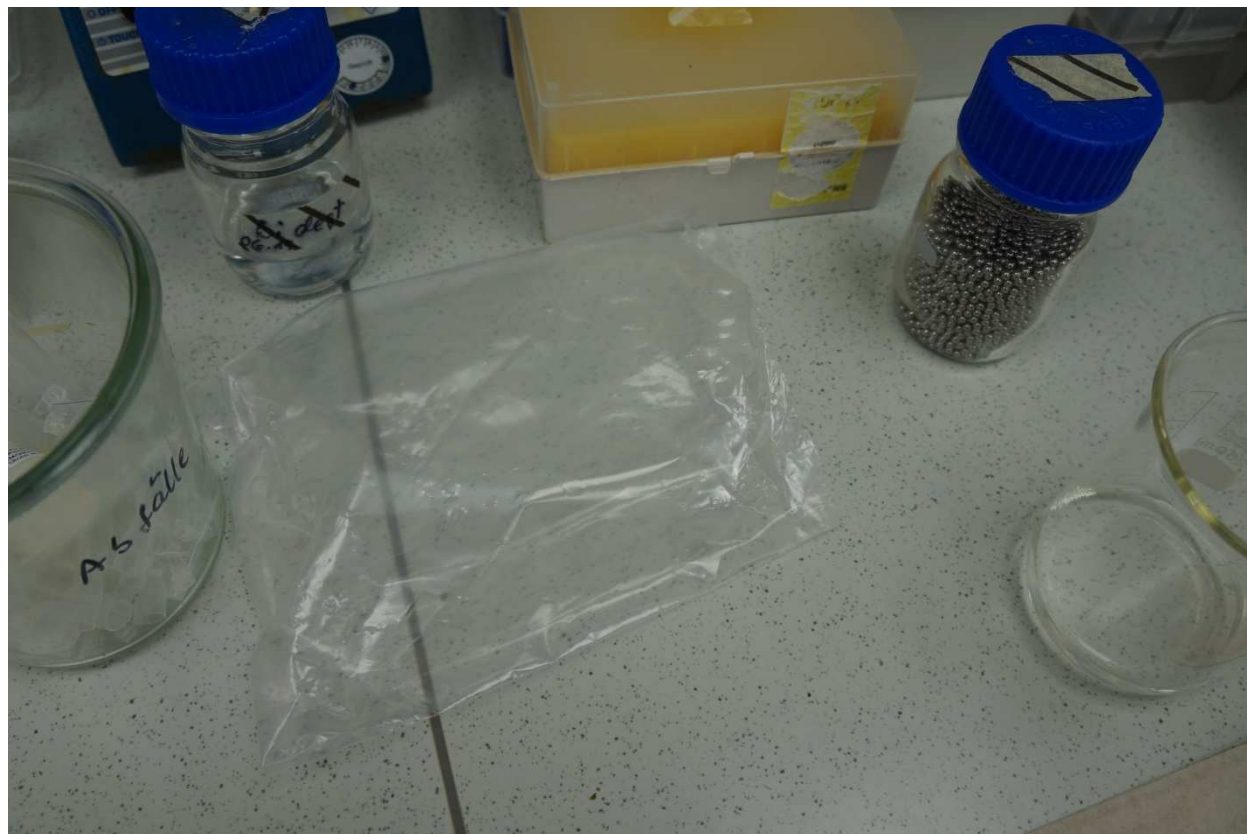


Рисунок 1. Шарики для дробления ДНК



Рисунок 2. Фотография неудовлетворительного (слева) и хорошего (справа) материала

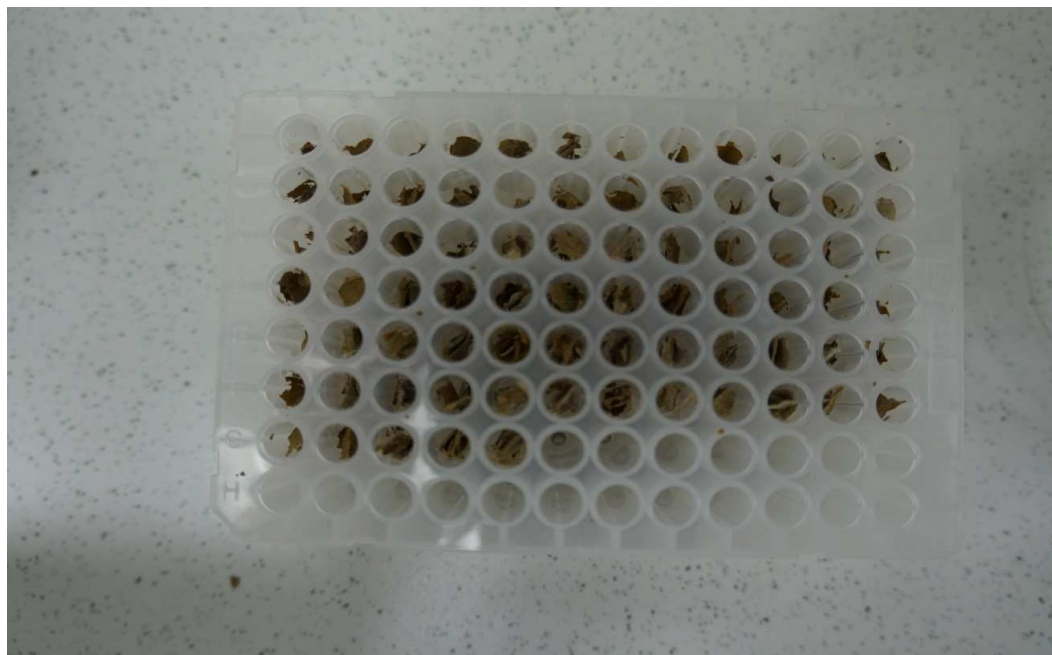


Рисунок 3. Растительный материал в 96-ти канальной плашке

2. Закрывать пленкой плашки, поместить их в лиофильную сушку. Лучше всего сушиться оставить на ночь для лучшего качества материала перед выделением ДНК.



Рисунок 4. Плашки, покрытые специальной липкой пленкой



Рисунок 5. Лиофильная сушка с плашками с листьями

3. После ночной сушки снять пленку, закрыть пробирки стрипсами и поставить листья дробиться на шейкер. Следует отметить, что как шейкер для дробления листьев был приспособлен и шейкер для перемешивания краски в банках. Иногда требуется повторить дробление несколько раз. Временами даже приходится применять промежуточное центрифугирование при дроблении, так как крупные части могут прилипнуть к стенкам и крышкам плашки.

4. После дробления процентрифугировать со скоростью 6000 оборотов для осаждения пыли и частиц на дно плашки. Время центрифугирования большого значения не имеет. Как только достигнуты 6000 оборотов, центрифуга останавливается.

5. Из набора для выделения ДНК достать лиофилизированную РНКазу и разбавить ее 2,5 мл воды.

6. В небольшом судочке (см. картинку) смешать 50 мл буфера PL1 и 1000 мкл РНКазы. Судочек нужен для того, чтобы удобнее было работать многоканальной пипеткой.



Рисунок 6. Рабочий стол во время выделения ДНК. Слева вверху, на столе, те самые судочки для смешения реактивов и для удобной работы многоканальной пипеткой

7. При помощи восьмиканальной пипетки к каждому образцу прилить 510 мкл получившейся смеси.

8. После разбавления поставить на 3 минуты и поставить снова перемешиваться на шейкер для краски.

9. Центрифугировать 30 секунд при 1500 оборотах в минуту.

10. Инкубировать на 65⁰ С 30 минут.

11. Центрифугировать 20 минут при 6000 оборотах в минуту.

12. Пока идет центрифугирование рекомендуется подготовить пару новых Squarewell-block (см. фотографию). В каждую ячейку прилить по 450 мкл Bindingbuffer. Как это сделано, выставить ещё две Squarewell-block и вставить в них по NucleospinPlant 2 BindingPlate.

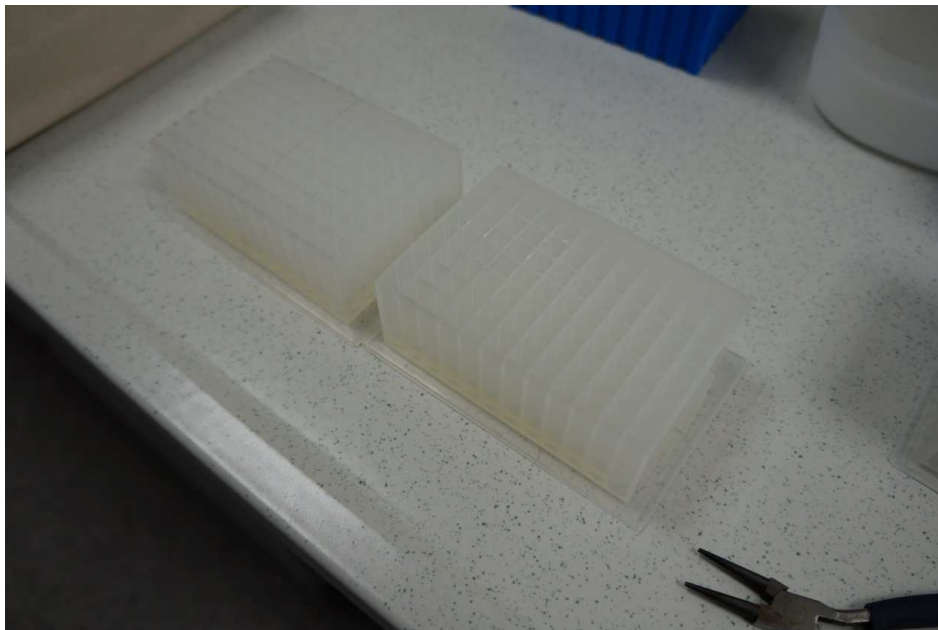


Рисунок 7. Square well-block с налитым внутрь Binding buffer

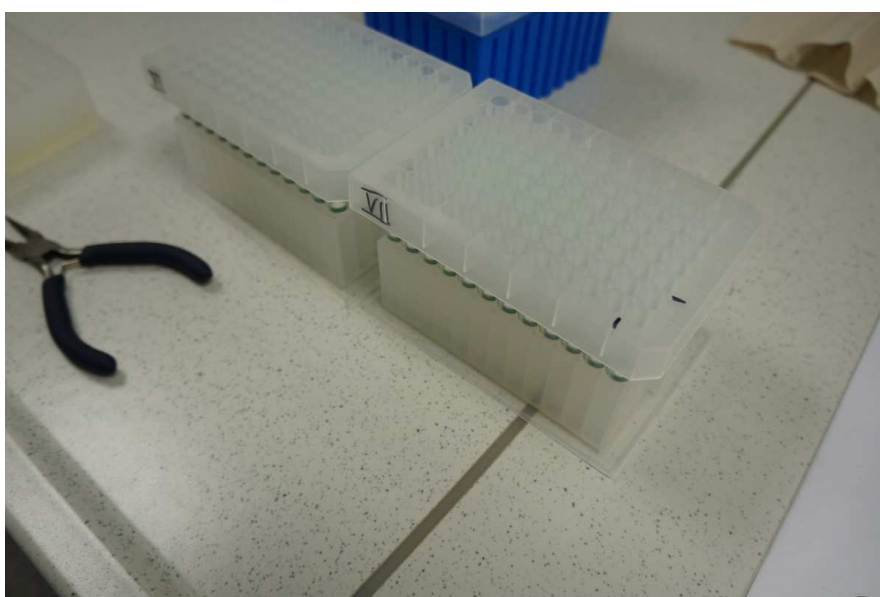


Рисунок 8. Square well-block с вставленной внутрь Nucleo spin Plant 2 Binding Plate

13. После центрифугирования берем по 500 мкл супернатанта, смешиваем с Bindingbuffer и весь объем переносим в Bindingplate. Потом, как все закончили, покрываем сверху Bindingplate липкой бумагой.

14. Снова центрифугируем 5 минут на 6000 оборотах в минуту. После чего, с нижней платы сливаем жидкость в раковину. Во время центрифугирования можно подготовить Washbuffer 1, налив его в новое судно.

15. После удаления жидкости снизу, протираем планшету и в Bindingplate приливаем Washbuffer 1.

16. Центрифугируем 2 минуты 6000 оборотов в минуту. Жидкость снизу снова сливаем. Данный этап можно повторить еще раз для достижения более чистого результата.

17. В новом судочке подготавливаем Washbuffer 2, предварительно доведенный до нужного состояния добавлением спирта. В верхние колонки приливаем по 700 мкл его, покрываем липкой бумагой, и центрифугируем 6000 оборотов в минуту 2 минуты. Этот этап следует повторить потом еще раз.

18. Elutionbuffer оставить нагреваться до 65⁰ С. Параллельно выставить на стол две плашки для осажденной ДНК (Elutionplate).

19. В верхнюю плашку, после второго промывания налить 50 мкл Elutionbuffer и центрифугировать 6000 оборотов в минуту. Этот этап можно повторить еще раз или прилить в верхнюю плашку 100 мкл

осаждающего буфера, оставить на 65⁰ С по 30-40 минут и затем центрифугировать.

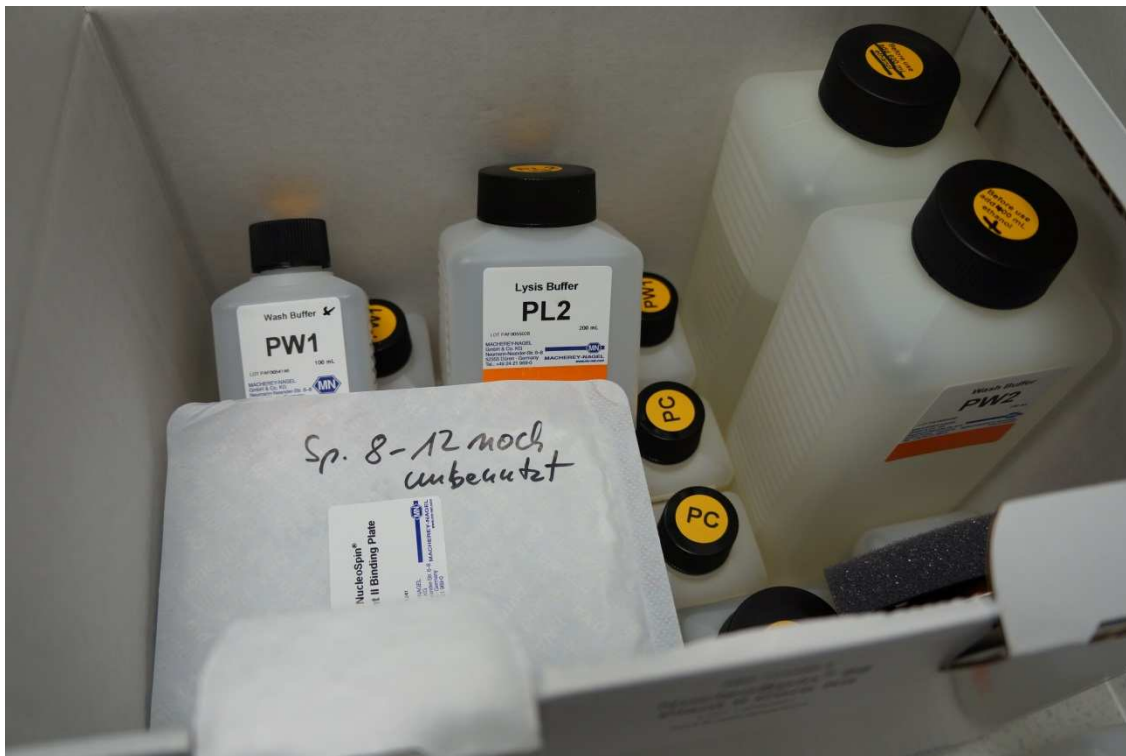


Рисунок 9. Набор в полном сборе

Таким образом, данный набор позволяет выделять сразу довольно большое количество образцов. Единственное, вызывает сожаление только то, что надо долго готовиться к выделению. Тут подходит поговорка: долго запрягаем, зато быстро едем.

В общей сложности, в данной работе было выделено 120 образцов ДНК, которые представлены в таблице ниже. Проверка количества ДНК проводилась на CLARIOstar [7].

Таблица. – Количество выделенной ДНК

WellRow	WellCol	Content	dsDNA concentration: (50 * x) * Dilution(x) in ng/µl (calculated)
A	10	A1	1,86
B	10	B1	2,84
C	10	C1	5,04

D	10	D1	2,59
E	10	E1	3,16
F	10	F1	1,88
G	10	G1	2,25
H	10	H1	7,76
A	11	A2	5,16
B	11	B2	3,98
C	11	C2	4,86
D	11	D2	3,32
E	11	E2	3,57
F	11	F2	2,22
G	11	G2	7,54
H	11	H2	0,92
A	10	A3	5,13
B	10	B3	2,41
C	10	C3	1,87
D	10	D3	1,6
E	10	E3	1,62
F	10	F3	1,36
G	10	G3	0,35
H	10	H3	3,19
A	11	A4	3,33
B	11	B4	4,98
C	11	C4	3,66
D	11	D4	3,85
E	11	E4	3,19
F	11	F4	2,01
G	11	G4	2,85
H	11	H4	1,31
A	10	A5	5,83
B	10	B5	3,93
C	10	C5	4,04
D	10	D5	0,13
E	10	E5	5,45
F	10	F5	1,26
G	10	G5	3,56
H	10	H5	1,19
A	11	A6	5,4
B	11	B6	4,56
C	11	C6	4,17
D	11	D6	0,94
E	11	E6	1,57

F	11	F6	1,83
G	11	G6	3,84
H	11	H6	2,36
A	10	A7	2,67
B	10	B7	53,57
C	10	C7	3,2
D	10	D7	3,14
E	10	E7	0,14
F	10	F7	2,57
G	10	G7	7,47
H	10	H7	6,29
A	11	A8	5,33
B	11	B8	1,85
C	11	C8	3,84
D	11	D8	3,23
E	11	E8	1,8
F	11	F8	5,08
G	11	G8	7,41
H	11	H8	9,74
A	10	A9	4,42
B	10	B9	2,47
C	10	C9	2,5
D	10	D9	2,96
E	10	E9	0,69
F	10	F9	1,93
G	10	G9	6,31
H	10	H9	11,09
A	11	A10	2,97
B	11	B10	15,73
C	11	C10	3,65
D	11	D10	3,49
E	11	E10	2,69
F	11	F10	-3,61
G	11	G10	15,15
H	11	H10	11,51
A	10	A11	4,13
B	10	B11	3,92
C	10	C11	3,76
D	10	D11	3,74
E	10	E11	1,65
F	10	F11	4,23
G	10	G11	9,64

Н	10	Н11	2,64
А	11	А12	12,94
В	11	В12	1,47
С	11	С12	1,4
Д	11	Д12	3,64
Е	11	Е12	2,28
F	11	F12	4,2
G	11	G12	4,65
Н	11	Н12	21,53
А	10	А1(2)	16,39
В	10	В1(2)	4,11
С	10	С1(2)	1,05
Д	10	Д1(2)	8,64
Е	10	Е1(2)	10,44
Ф	10	Ф1(2)	6,8
G	10	G1(2)	17,27
Н	10	Н1(2)	4,2
А	11	А2(2)	4,17
В	11	В2(2)	3,78
С	11	С2(2)	5,83
Д	11	Д2(2)	5,73
Е	11	Е2(2)	12,13
Ф	11	Ф2(2)	6,56
G	11	G2(2)	4,67
Н	11	Н2(2)	8,94
А	11	А3(2)	3,19
В	11	В3(2)	2,27
С	11	С3(2)	2,83
Д	11	Д3(2)	4,74
Е	11	Е3(2)	16,66
Ф	11	Ф3(2)	16,65
G	11	G3(2)	6,7
Н	11	Н3(2)	6,55

Таким образом, набор позволяет быстрое выделение 192 образцов ДНК в течение 2,5-3 часов.

ВЫВОДЫ

В итоге мы можем увидеть, что ДНК выделилась удовлетворительного качества из обоих типов образцов. Пики, полученные после фрагментарного анализа, были хорошего качества, при том, что ни один образец не разбавляли водой для достижения нужной концентрации. Из этого можно сделать вывод, что набор направлен на получение концентрации ДНК из образцов, сразу пригодной для ПЦР-анализа, чтобы не терять время на анализ его количества и разбавления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Akkurt M. Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). - Department of Horticulture: Ankara University, Ankara / Turkey.
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. Lemke L., Rex M., Zyprian E. and Töpfer R. A simple, inexpensive and environmentally friendly method for highthrough put DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.) // Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants (Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof). – Siebeldingen / Germany. – 2011. – 4.
5. 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.
6. Web-site <http://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNAPurification/GenomicDNA/DNAfromplantandfungi/NucleoSpin896PlantII/tabid/10905/language/en-US/Default.aspx>.
7. Web-site <http://www.selectscience.net/products/clariostar/?prodID=172635>.

REFERENCES

1. Zvjagin A.S. Vydelenie DNK iz gerbarnyh list'ev *Vitis vinifera* L. // Politematicheskij setevoj 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.

2. Akkurt M. Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). - Department of Horticulture: Ankara University, Ankara / Turkey.

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. Lemke L., Rex M., Zyprian E. and Töpfer R. A simple, inexpensive and environmentally friendly method for highthrough put DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.) // Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants (Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof). – Siebeldingen / Germany. – 2011. – 4.

5. 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.

6. Web-site <http://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNAPurification/GenomicDNA/DNAfromplantandfungi/NucleoSpin896PlantII/tabid/10905/language/en-US/Default.aspx>.

7. Web-site <http://www.selectscience.net/products/clariostar/?prodID=172635>.