

**Пензин А.А.,
Тимкин П.Д.**

Всероссийский научно-исследовательский институт сои», Россия,
Благовещенск
raa@vniisoi.ru

МОДИФИКАЦИЯ СТАВ МЕТОДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ПОГИБШИХ РАСТЕНИЙ

Реферат. Для успешного проведения ПЦР анализов требуется использование высококачественной ДНК. Процесс выделения ДНК основан на физико-химических процессах и, как правило, протекает в нескольких, схожих для разных методик, этапах. Первым этапом выделения ДНК является разрушение клеточной оболочки растения, посредством механического воздействия на них, что способствует получению гомогенной многокомпонентной смеси, данный этап проводят с использованием различных лизирующих буферов, способствующих деградации клеточной стенки. Наличие в гомогенизате различных примесей, таких как белки, липиды, ферменты, фрагменты РНК и т.д. негативно сказываются на качестве получаемой ДНК, поэтому на следующем этапе происходит их осаждение, после чего раствор ДНК переносится в отдельную пробирку и осаждается, над-осадочная жидкость удаляется, осадок промывается и разводится до необходимой концентрации. Наиболее подходящим материалом для выделения является первый настоящий лист 7-10 дневного проростка, но бывают случаи, когда по различным причинам может произойти гибель растения, а повторное его выращивание займет слишком много времени, или же вообще не представляется возможным ввиду отсутствия дополнительного семенного материала. Для решения этой проблемы был поставлен опыт по выделению ДНК из погибшего растения. В начале эксперимента методом влажных рулонов были поставлены на проращивание 10 семян сои, до

момента появления первых листьев, после чего ростки были срезаны, просушены в течение 7 дней под прямыми солнечными лучами и использованы для выделения ДНК различными модификациями СТАВ метода. Первый образец выделялся по стандартному протоколу, второй образец с двойным содержанием растворителей, третий – с удвоенной массой образца относительно стандарта, четвертый- с удвоением, как материала, так и растворителей. Данные электрофореграм полученные в конце эксперимента позволяют сделать вывод о возможности использования СТАВ метода для успешного выделения ДНК из сухих образцов. Наиболее подходящим является способ выделения, применяемый ко второму образцу.

Ключевые слова: Соя, листья, погибшее растение, экстракция ДНК, СТАВ метод, *satt141*

Abstract. Successful PCR assays require the use of high-quality DNA. The process of DNA isolation is based on physico-chemical processes and, as a rule, proceeds in several stages that are similar for different techniques. The first stage of DNA isolation is the destruction of the cell wall of the plant, through mechanical action on them, which contributes to the production of a homogeneous multicomponent mixture, this stage is carried out using various lysing buffers that contribute to the degradation of the cell wall. The presence of various impurities in the homogenizer, such as proteins, lipids, enzymes, RNA fragments, etc., negatively affect the quality of the DNA obtained, therefore, at the next stage, their precipitation occurs, after which the DNA solution is transferred to a separate test tube and precipitated, the above-sedimentary liquid is removed, the precipitate is washed and diluted to the required concentration. The most suitable material for isolation is the first real leaf of a 7-10-day-old sprout, but there are cases when, for various reasons, the death of the plant may occur, and its re-cultivation will take too much time, or it is not possible at all

due to the lack of additional seed material. To solve this problem, an experiment was set up to isolate DNA from a dead plant. At the beginning of the experiment, 10 soybean seeds were put on germination by wet rolls until the first leaves appeared, after which the sprouts were cut, dried for 7 days in direct sunlight and used for DNA isolation by various modifications of the method. The first sample was isolated according to the standard protocol, the second sample with double the content of solvents, the third – with twice the mass of the sample relative to the standard, the fourth - with a doubling of both the material and the solvents. The electrophoregram data obtained at the end of the experiment allow us to conclude that the CTAB method can be used to successfully isolate DNA from dry samples. The most suitable is the extraction method applied to the second sample.

Keywords: Soy, leaves, dead plants, DNA extraction, BECOMING method, *set*
141

Введение. ПЦР-анализ на сегодняшний день приобрел большое распространение и позволяет в кратчайшие сроки выполнять такие анализы как установление родства двух и более организмов, идентификация сортов, диагностика заболеваний, клонирование генов и т.д. [1]

Успех и качество проведения ПЦР зависит не только от таких факторов как время и температура отжига, специфичность подобранных праймеров, количество циклов, но и от качества выделенной ДНК, наличия в ней посторонних элементов и загрязнения посторонней ДНК. [2,3].

Основная сложность в получении высококачественной ДНК из сои – большое количество вторичных метаболитов, а также повышенная концентрация белков в образцах, что при недостаточной очистке отрицательно сказывается на проведении ПЦР [4].

Одним из самых эффективных методов выделения ДНК, применяемый по сей день, является СТАВ метод. Главной особенностью является использование бромида цетримониума который наилучшим образом избавляет смесь от вторичных продуктов, а так же удаление белков хлороформом и осаждение ДНК изопропанолом [5].

Целью проведённых исследований была модификация стандартного СТАВ метода для выделения пригодной для ПЦР анализа ДНК.

Материалы и методы. Для проведения эксперимента в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои методом влажных рулонов были получены проростки сои сорта Лидия. После появления первых зелёных листьев на 10 день растения были срезаны и оставлены без доступа к влаге под прямыми солнечными лучами на 7 дней. Полученный материал разделили на 4 группы согласно схеме опыта (Табл. 1).

Таблица 1.

Схема проведения опыта

Образец	Условия
1	Стандартный СТАВ метод
2	СТАВ метод с удвоенным объёмом растворителей
3	СТАВ метод с удвоенной массой навески
4	СТАВ метод с двойной массой навески и удвоенным объёмом растворителей

Масса навески первого и второго образцов 100мг, масса третьего и четвертого 200мг.

Для детекции наличия ДНК был применён метод гель-электрофореза в 2,5% агарозном геле, с окрашиванием образцов бромистым этидием.

О чистоте выделенной ДНК судили по результатам амплификации специфичного для сорта Лидия маркера *satt141*.

Результаты и обсуждения.

На подготовительном этапе опыта были получены проростки удовлетворительного качества (Рис. 1).



Рис. 1. 10-ти дневные проростки сои.
Слева – свежесрезанные, справа – просушенные в течение 7 дней

Из имеющихся проростков были выбраны и отделены наиболее подходящие образцы. Растения, ввиду отсутствия доступа к влаге, а так же от действия прямых УФ лучей, подверглись сильному некрозу.

Далее, согласно схеме опыта (Табл. 1), были подготовлены пробы и выделена ДНК. На полученных электрофореграммах видно, что наибольшее количество ДНК удалось выделить из третьего образца с удвоенной массой навески (Рис. 2).

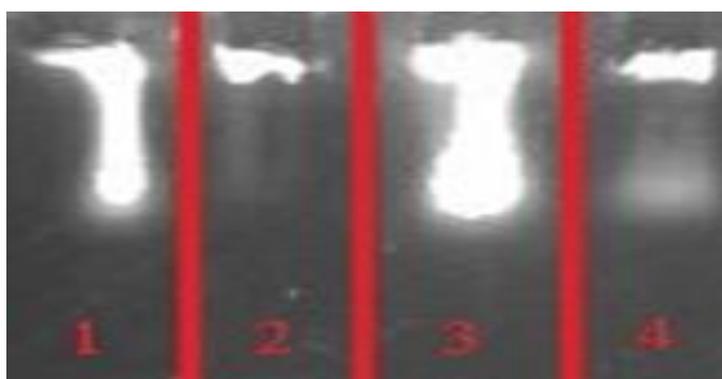


Рис. 2. Электрофореграмма выделенной ДНК
(1,2,3,4 – номера образцов)

На рисунке 2 отчетливо видно наличие ДНК во всех образцах. Наиболее интенсивное свечение, указывающее на большую концентрацию ДНК, отмечается в первом и третьем образцах, что логично, исходя из большей массы навески по отношению к реакционной смеси.

С целью определения чистоты выделенной ДНК, а так же в качестве контроля проделанной работы был проведён ПЦР анализ с использованием микросателлитного маркера *satt141* (Рис. 3).

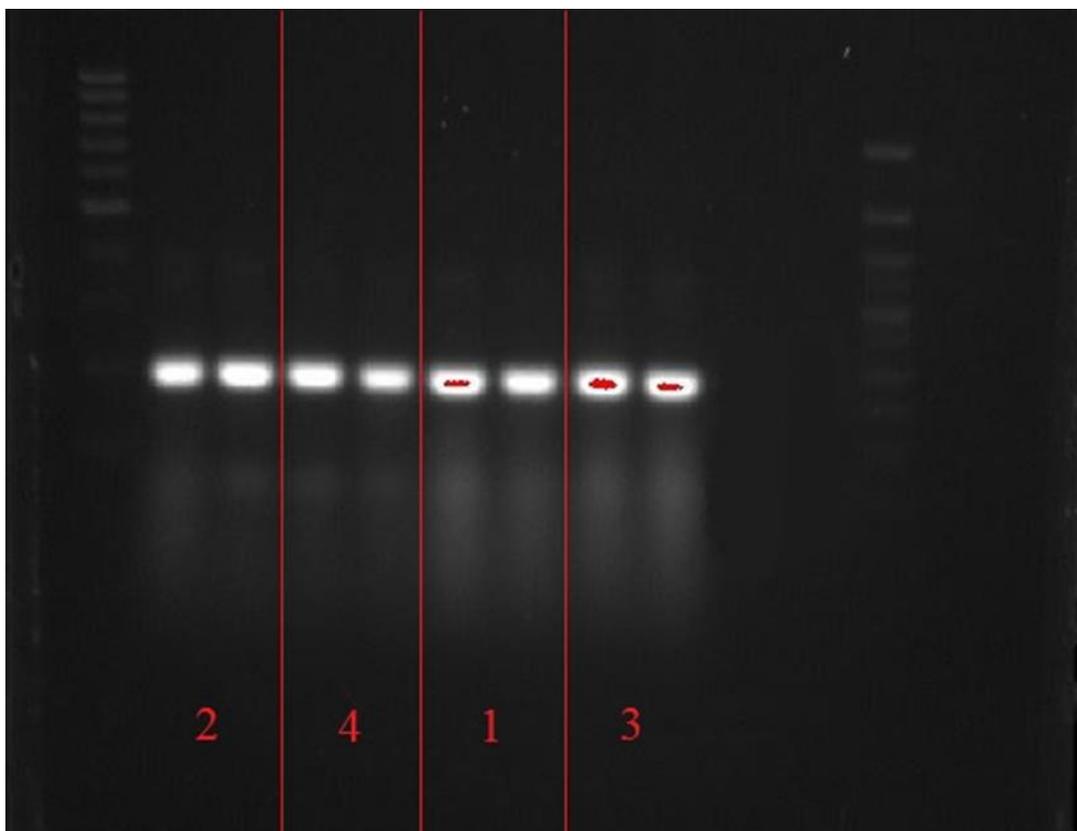


Рис.3. Электрофореграмма результатов амплификации (1,2,3,4 – номера образцов)

На электрофореграмме (Рис. 3) видно, что во всех образцах наблюдаются отчетливо различимые неспецифичные фракции, что по нашему мнению связано с повышенным содержанием сухого вещества в образцах, во втором и четвертом образцах различимых неспецифичных фракций меньше, что, скорее всего, связано с увеличением объёма растворителей.

Выводы. Результаты проведённых исследований позволяют сделать однозначный вывод о возможности выделения чистой ДНК в нужном для проведения ПЦР анализа количестве. Наиболее подходящими образцами

являются те, в выделении которых использовался двойной объём растворов, что, по нашему мнению, связано с лучшим лизисом клеточных оболочек, экстрагированием ДНК и осаждением посторонних фракций.

Список литературы.

1. Остроумов Л. А., Просеков А. Ю., Архипов А. Н., Мудрикова О. В. Метод выделения растительной ДНК из растений и продуктов питания на их основе // Известия Самарского научного центра РАН. 2010. №4-3.

2. Recommendations for setting up PCR [Electronic resource]// Reagents for PCR and PCR-RV: CJSC Eurogen. URL: <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf> (accessed: 27.07.22)

3. Антонова О. С., Рудницкая Г. Е., Тупик А. Н., Буляница А. Л., Евстапов А. А., Курочкин В. Е. Полимеразная цепная реакция: приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик // НП. 2011. №4.

4. Логинова Е. Н. Метод выделения и количественного определения ДНК в белковых препаратах, вырабатываемых из генетически модифицированных растений // Научнопрактическая конференция «Технологические аспекты комплексной переработки сельскохозяйственного сырья при производстве экологически безопасных продуктов общего и специального назначения». Труды (Углич, 11-14 сент. 2002 г.).-Углич, 2002.- С. 340-343

5. Doyle J.J. and Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin. 19, 11–15;

Penzin A.A.,

Timkin P.D.

All-Russian Research Institute of SOY", Russia, Blagoveshchensk
**MODIFICATION OF THE STAV METHOD FOR ISOLATING
DNA FROM DEAD PLANTS**