

Установлено, что удельная активность ПФО значительно снизилась в зараженных патогеном семенах сои по сравнению с контрольными образцами для изученных сортов Топаз, Веретейка, Сентябринка, Даурия, Золушка, Даурия, что характеризует невысокую устойчивость данных сортов к заболеванию *Cercospora sojina* Nara. Для сортов Кружевница и Умка значения удельной активности ПФО, наоборот, в зараженных семенах превысили значения фермента в контрольных образцах.

В результате полученных данных можно сделать вывод, что активность изученного фермента варьирует в зависимости от вида сорта сои и от влияния патогена *Cercospora sojina* Nara, значит, выбранный фермент является очень отзывчивым на воздействие биотического фактора, его можно использовать в качестве тест-фермента.

Библиографический список

1. Авраменко, А. А. Оценка продуктивности и питательности смешанных посевов сои с однолетними злаковыми культурами в условиях приморского края [Текст] / А. А. Авраменко, Т. В. Наумова, О. В. Павлова // Вестник КрасГАУ. - 2020. - № 6 (159). - С. 56-61.

2. Damanik, R. I. Antioxidant activity of seedling growth in selected soybean genotypes (*Glycine max* (L.) Merrill) responses of submergence / R. I. Damanik, P. Marbun, L. Sihombing // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. - 2016. - № 41. - Pp. 012003.

3. Perez Piza, M. C. Improvement of growth and yield of soybean plants through the application of non-thermal plasmas to seeds with different health status / M. C. Perez Piza, L. Prevosto, P. E. Grijalba, C. G Zilli, E. Cejas, B. Mancinelli, K. B. Balestrasse // Heliyon. - 2019. - № 5. - Pp. e01495.

4. Кузнецова, В. А. Влияние гипо- и гипертермии на удельную активность ферментов класса оксидоредуктаз семян сои и множественность их форм [Текст] / В. А. Кузнецова, А. А. Блинова, Л. Е. Иваченко // Достижения науки и техники АПК. - 2020. - Т. 34. - № 8. - С. 39-44.

5. Taranto, F. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects / F. Taranto, A. Pasqualone, G. Mangini, P. Tripodi, M. M. Miazzi, S. Pavan, C. Montemurro // International journal of molecular sciences. - 2017. - № 18. - С. 377.

6. Коробко, В. В. Физиология растений: большой практикум. Учебное пособие для студентов биологического факультета [Текст] / В. В. Коробко, М. Ю. Касаткин. - Саратов: Саратовский источник, 2017. - 120 с. - ISBN 978-5-91879-762-4.

УДК 577.113

ПРОБЛЕМЫ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОТОКОЛА ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Лебедев Илья Константинович, аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, thisislebedevilya@yandex.ru

Аннотация: Основными требованиями к исследуемому материалу для различных молекулярных методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), рестрикционное картирование, исследование генетических аномалий, генотипирование, различные диагностические и

профилактические тесты, являются достаточная концентрация ДНК в растворе, отсутствие белковых и органических соединений, РНК [1]. На данный момент разработано большое количество протоколов для экстракции ДНК, однако в большинстве случаев они обладают такими недостатками как дороговизна и трудоёмкость в одних методах и низкое качество выделенной ДНК в других. В связи с этим разработка методов выделения ДНК, которые удовлетворяют современным, требования является актуальной задачей [2].

Ключевые слова: *экстракция ДНК, высокая концентрация ДНК, биологические материалы.*

Изучив отечественную и иностранную литературу, посвящённую данной проблеме можно утверждать, что не существует одного оптимального метода экстракции ДНК из всех возможных биологических материалов, которые могут быть использованы в качестве образца в исследованиях. Существенные различия в структуре клеток и тканей у разных биологических объектов не позволяют на данный момент разработать такой метод.

В нашей работе были изучены два метода экстракции ДНК, которые были опробованы на трёх разных биологических материалах от двух видов животных. Методы экстракции ДНК в работе представлены двумя типами. Первый - это экстракция ДНК, основанная на селективном связывании ДНК с силикатным носителем, такой метод представлен в виде коммерческого набора QIAGEN. Второй – это экстракция ДНК, основанная на магнитной сепарации, такой метод представлен коммерческим набором MagMAX CORE. В качестве исследуемых биологических материалов были взяты кровь, выщипы ткани и фолликулы волос от свиней и КРС. К каждому набору от производителя прилагается стандартная инструкция для экстракции ДНК из различных материалов, условно обозначили их как «Standard». Разработанные нами на основе имеющихся стандартных методов протоколы условно обозначили как «Own method 1, 2».

Качество выделения ДНК на прямую зависит от качества образца материала, взятого у животного, и условия хранения [3]. Так, например, на качество крови влияют следующие факторы:

- Спирт, который мог попасть в пробу крови в том случае, если перед инъекцией он не успел высохнуть в месте обработки;
- Плохое смешивание крови с ЭДТА, который является консервантом, в пробирке;
- Отсутствие консерванта в пробирке в связи с браком производства;
- Неправильное хранение проб;
- Неблагоприятные условия транспортировки (сильная тряска);
- Физиологическое состояние животного – потребление воды, корма перед забором крови, болезнь (в случае болезни количество выделенной ДНК увеличивается, так как увеличивается количество лейкоцитов в крови) и другое.

В нашей работе соблюдались все требования для отбора и хранения образцов всех типов.

После экстракции необходимо количественный и качественный анализ ДНК.

Измерение концентрации ДНК проводили на спектрофотометре NanoPhotometr NP80 с помощью сравнения оптической плотности чистого элюирующего буфера и раствора ДНК в нём. Значение оптической плотности чистой среды принимали за базовую линию. Для определения плотности базовой линии использовали 2 мкл раствора элюирующего буфера. Затем брали 2 мкл раствора ДНК и проводили анализ [4].

Для выявления примесей белков в растворах нуклеиновых кислот, анализируют соотношение поглощения растворов на длинах волн 260 и 280 нм ($OD_{260/280}$), ароматические аминокислоты в составе белков поглощают на 280 нм. Однако вклад примесей белков в определение концентрации нуклеиновых кислот небольшой — для того, чтобы повлиять на соотношение 260/280 в растворе нуклеиновой кислоты, концентрация белка должна быть значительной. Оптимальным значением $OD_{260/280}$ считается диапазон от 1,8 до 2.

Проведённые эксперименты по экстракции ДНК из биологических материалов разных типов от двух видов животных показали наличие корреляции между качеством выделенной ДНК и используемым протоколом. Так, например, результаты, представленные в таблице 1, показывают увеличение концентрации и чистоты ДНК при выделении из свиных выщипов набором QIAGEN протоколом «Own method 1» по сравнению со стандартом на 6,9% и 1,5% соответственно. Однако сравнивая стандарт и «Own method 2» наблюдается уменьшение концентрации ДНК на 2,2%. Наличие подобной разницы в результатах характерно для разных методов, протоколов при экстракции ДНК из различных биологических материалов, что представлено в таблицах 2 и 3.

Таблица 1

Результаты выделения ДНК из выщипов

Протокол Набор	Standard		Own method 1		Own method 2		Вид
	C, нг/мкл	$OD_{260/280}$	C, нг/мкл	$OD_{260/280}$	C, нг/мкл	$OD_{260/280}$	
QIAGEN	34,1±5	1,51±0,03	55,6±4	1,61±0,04	55,8±2	1,61±0,04	КРС
MagMAX CORE	45,4±3	1,74±0,07	60,7±7	1,64±0,05	65,7±8	1,74±0,05	
QIAGEN	634±51	1,91±0,06	678±42	1,94±0,07	620±52	1,89±0,05	Свинья
MagMAX CORE	55,4±4	1,45±0,08	58,4±4	1,51±0,07	56,2±7	1,41±0,07	

В таблице 2 представлены результаты выделения ДНК из волосяных фолликул отобранных от КРС тремя методами с помощью двух коммерческих наборов.

Таблица 2

Результаты выделения ДНК из волосяных фолликул

Протокол Набор	Standard		Own method 1		Own method 2		Вид
	C, нг/мкл	$OD_{260/280}$	C, нг/мкл	$OD_{260/280}$	C, нг/мкл	$OD_{260/280}$	
QIAGEN	10,1±2	1,21±0,06	12,8±4	1,31±0,07	11,4±2	1,31±0,04	КРС
MagMAX CORE	22,6±1	2,05±0,04	34,1±6	1,99±0,07	42,7±6	1,84±0,05	

В таблице 3 представлены результаты выделения ДНК из выщипов отобранных от КРС и свиней тремя методами с помощью двух коммерческих наборов.

Таблица 3

Результаты выделения ДНК из крови

Протокол Набор	Standard		Own method 1		Own method 2		Вид
	C, нг/мкл	OD _{260/280}	C, нг/мкл	OD _{260/280}	C, нг/мкл	OD _{260/280}	
QIAGEN	54,1±8	1,72±0,04	60,6±4	1,73±0,06	61,4±8	1,66±0,09	КРС
MagMAX CORE	19,4±9	1,54±0,05	26,7±7	1,45±0,09	36,7±9	1,56±0,07	
QIAGEN	70±6	1,91±0,06	75±4	1,96±0,05	75±6	1,91±0,06	СВИНЬЯ
MagMAX CORE	35,6±4	1,48±0,07	46,4±7	1,53±0,04	48,9±6	1,51±0,03	

Также качество образца проверяется с помощью электрофореза в агарозном геле. Выделенная ДНК из образца должна меть один чёткий бэнд [5]. На рисунке 1 изображен электрофорез некоторых образцов крови. На нем видно, что все образцы, выделенные на наборе от компании QIAGEN четкий бэнд высокой интенсивности, что также косвенно показывает на более высокую концентрацию ДНК. Форез ДНК тех же самых образцов, но выделенных набором MagMAX CORE, показывает, что при выделении часть геномной ДНК у некоторых образцов была разрушена, а судя по интенсивности свечения концентрация ниже.

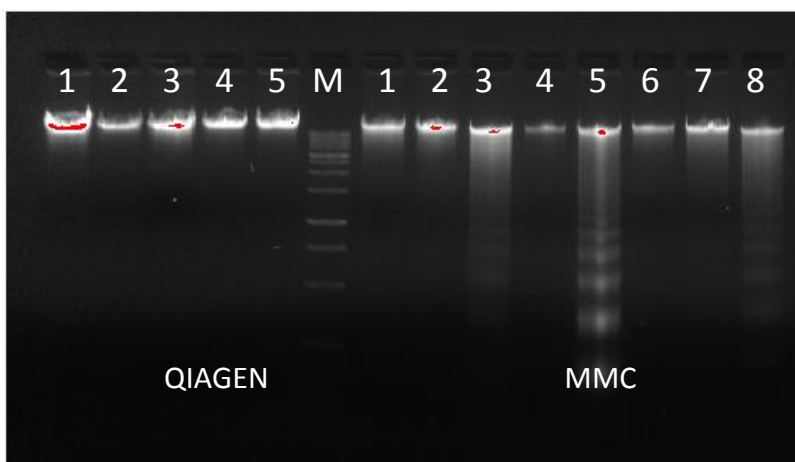


Рис. 1. Геномная ДНК, выделенная из проб крови КРС, в агарозном геле двумя коммерческими наборами

Однако количество разрушенной ДНК не существенно по сравнению с количеством оставшейся геномной ДНК, это видно по четким одиночным бэндам, и на конечный результат анализа не повлияет.

В результате исследования мы разработали для каждого коммерческого набора по 2 метода для различных типов биологического материала, которые могут позволить увеличить выход ДНК без существенных дополнительных изменений стандартных протоколов, которые были составлены производителями данных наборов. Из данного исследования мы делаем вывод, что экстракция ДНК из различных биологических материалов не может быть проведена одним методом и с одинаковой эффективностью,

что связано с физиологическими свойствами тканей и клеток соответствующего материала. Кроме того, существенные различия в результатах экстракции ДНК можно встретить и при использовании одного и того же метода для одного типа ткани, но взятых от разных видов животных. Так концентрация ДНК при выделении из свиных выщипов набором QIAGEN кратно, чем аналогичные методы при выделении ДНК из выщипов отобранных у КРС.

Библиографический список

1. Cattaneo C. et al. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences // Journal of Forensic Science. - 1997. - Т. 42. - №. 6. - С. 1126-1135.
2. Phillips H. A., Howard G. C. W., Miller W. R. p53 mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer // British journal of cancer. - 2000. - Т. 82. - №. 1. - С. 136-141.
3. Wang S. S. et al. Homogeneous real-time detection of single-nucleotide polymorphisms by strand displacement amplification on the BD ProbeTec ET system // Clinical Chemistry. - 2003. - Т. 49. - №. 10. - С. 1599-1607.
4. Angelini A. et al. New method for the extraction of DNA from white blood cells for the detection of common genetic variants associated with thrombophilia // Pathophysiology of haemostasis and thrombosis. - 2002. - Т. 32. - №. 4. - С. 180-183.
5. Аукунов, Н. Е. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе [Текст] / Н. Е. Аукунов, М. Р. Масабаева, У. У. Хасанова // Наука и здравоохранение. - 2014. - №. 1.

УДК 631.8

ВЛИЯНИЕ КОГЕРЕНТНОГО СВЕТА НА КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МАСЛА *CAMELINA SATIVA L.*

Капристова Инна Ивановна, аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, kapristova00@mail.ru

Киракосян Рима Нориковна, доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, mia41291@mail.ru

Аннотация: *Повышение продуктивности и урожайности сельскохозяйственных культур, а также улучшение качества получаемой продукции является приоритетным направлением современного сельского хозяйства. В последнее время все чаще стали применять обработку семян или вегетирующих частей растений регуляторами роста или факторами физической природы. В данной работе мы изучили влияние когерентного света на посевные качества семян и качественный состав масла рыжика посевного (*Camelina sativa L.*).*

Ключевые слова: *Camelina sativa, когерентное излучение, масло.*

Выращиванию масличных культур уделяется особое внимание, в силу их использования как потенциальных источников получения масла, а также для