

4. Li W., Wang, J.P., Shigematsu M., Lu G.Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Amomum Tsao-Ko* cultivated in Yunnan area. // *Advanced Materials Research*. **2011**, 183, p. 910-914.

5. Loi D.T. Vietnamese medicinal plants and herbs. Medical Publishing House: Hanoi, Vietnam, 2001; pp. 400-408.

6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. // *Physiol. Plant*. **1962**, 15, 473-497.

7. Nguyen D.M., Ngo V.T., Do T.H.V., Le N.T. Study of chemical composition of *Amomum longiligulare* T.L. Wu seeds. // *Journal of Science, Technology and Food*. **1994**, 390(12), 464-465.

УДК 58.085

ОБЗОР МЕТОДИК ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ БАТАТА

Сумин Антон Вадимович, аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, sumin.anton1997@gmail.com

Киракосян Рима Нориковна, доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, r.kirakosyan@rgau-msha.ru

Аннотация: в данной статье произведен анализ данных об эффективном выделении протопластов батата (*Ipomoea batatas* L). Рассмотрены основные составляющие методик. Приведены протоколы выделения, которые могут быть применены на изучаемой культуре.

Ключевые слова: батат, протопласты, выделение протопластов.

Исследования по выделению протопластов батата *Ipomoea batatas* L велись с конца двадцатого века (Wu and Ma 1979, Kobayashi *et al.* 1990 и др.) [1]. Протопласты являются удобным объектом для использования в различных научных целях, таких как слияние протопластов, трансфекция и проверка наличия транзientной экспрессии.

Важный шаг в процессе выделения протопластов – это выбор первичного экспланта. Так, в качестве эксплантов используют стерильные части стебля, черешков и листьев. Большое значение уделяется возрасту растительного материала. В исследовании Belarmino *et al.* (1996) сообщается, что молодые листья являются лучшим источником жизнеспособных протопластов, чем более зрелые листья, поскольку имеют более высокую плотность и жизнеспособность [1].

В работе Belarmino *et al.* (1994) в качестве материала использовали стерильные черешки и стебли *I. batatas* L и *I. lacunosa* L, которые нарезались на части 2-3мм длиной [2]. А в более позднем исследовании J.M.Guo *et al* используются стерильные молодые листья трехнедельного возраста, которые нарезаются на полоски 2x2мм [3].

Перед этапом расщепления клеточной стенки, экспланты подвергают плазмолизу. Так, в исследовании Belarmino *et al* используется раствор для

плазмолиза, содержащий соли и витамины по прописи MS с добавлением 9,0% маннитола [2]. Инкубация производится в течение одного часа.

Клеточную стенку расщепляют при помощи целлюлазы, либо сочетанием целлюлазы и мацерозима, также пектолизом и гемицеллюлазой [1]. Так, в исследовании J.M.Guo et al Лизирующий раствор состоит из 0,1% пектолиазы, 2% целлюлазы, 0,6М D-маннитола, 0,5% CaCl₂ x 2H₂O и 5,0 mM MES [3]. В работе Belarmino et al также предлагается добавлять 9% маннитол и 1% сахарозу [2]. Кислотность раствора должна находиться в пределах pH 5,6-5,8 [1,2,3]. Инкубация в лизирующем растворе проводится в течение 8-12 часов в темноте при температуре 27⁰C. В дальнейшем смесь фильтруют через 50 μm либо 100 μm нейлоновый фильтр.

Этап очистки протопластов батата описывается в исследовании Liu et al (1991). После фильтрации протопласты переносятся на 20% раствор сахарозы и центрифугируются при условиях 300xg в течение 10 минут [4]. Очищенные протопласты переносятся в раствор W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂x 2H₂O, 5 mM KCl, 5 mM глюкозы, pH 5.8), центрифугируются в течение 4 минут при 200xg [4,5]. Данный этап повторяется дважды.

После выделения протопласты могут быть использованы для использования в методиках слияния, трансфекции и др. [6].

Работа выполнена в рамках Тематического плана-задания на выполнение научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2022 году.

Библиографический список

1. A.Mukherjee, S.K.Naskar, K.R.Rao, R.Ray, Sweet potato:gains through biotechnology/ Mukherjee A, Naskar S.K, Rao K.R.,Ray R.//Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology (special issue 1). – 2012. №6 . – P. 30-42
2. M.M. Belarmino , T. Abe, T. Sasahara, Plant regeneration from stem and petiole protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its wild relative, *I. lacunose*/ Belarmino M.M., Abe T., Sasahara T.// Plant cell, tissue and organ culture.- 1994.№37.– P.145-150
3. J. M. Guo, Q.C. Liu, H. Zhai, Y.P. Wang, Regeneration of plants from *Ipomoea cairica* L. protoplasts and production of somatic hybrids between *I. cairica* L. and sweetpotato, *I. batatas* (L.) Lam./ Guo J. M., Liu Q.C., Zhai H., Wang Y.P.// Plant cell tissue and organ culture.- 2006. №87.-P.145-150
4. .C. Liu, T. Kokubo, M. Sato, Plant Regeneration from *Ipomoea trioba* L. protoplasts / Liu QC, Kokubo T , Sato M // Japan.J.Breed. – 1991. №41. – P. 103-108.
5. QI. Negrutiu , D. De Brouwer, J. W. Watts , V. I. Sidorov, R. Dirks, M. Jacobs, Fusion of plant protoplasts: a study using auxotrophic mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*, Viviani./ Negrutiu I., De Brouwer D., Watts J. W., Sidorov V. I. Dirks R., Jacobs M.// Theoretical and Applied Genetics. – 1986. №72 . – P. 279-286.
6. Y. Yang, S. Guan, H. Zhai, S. He, Q. Liu, Development and evaluation of a

storage root-bearing sweetpotato somatic hybrid between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and *I. triloba* L./ Yang Y., Guan S. Zhai H., He S., Liu Q. // Plant cell, tissue and organ culture. – 2009. №99. – P. 83-89

УДК 57.08

ПОВТОРНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОММЕРЧЕСКИХ НАБОРОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ БЕЗ РИСКА КОНТАМИНАЦИИ

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

***Аннотация:** Выделение нуклеиновых кислот (НК) – один из базовых методов молекулярной биологии. На данный момент времени самым удобным вариантом получения НК является использование коммерческих наборов, они позволяют быстро и эффективно выделить из биологического образца НК, удовлетворяющую всем требованиям. Однако у таких наборов есть существенный недостаток – высокая стоимость. В данной статье рассматривается возможность восстановления способности связывания НК в ранее использованных колонках с фильтрами из силикатных материалов коммерческих наборов без риска контаминации и высоким выходом НК.*

***Ключевые слова:** нуклеиновые кислоты, выделение ДНК, коммерческие наборы, восстановление, повторное использование.*

Для анализа НК нужно подготовить высококачественные образцы с помощью так называемых «коммерческих наборов», которые поставляются в виде готового набора реагентов для выделения НК из образца. В процессе выделения твердая фаза системы – сорбент – адсорбирует на себя нуклеиновые кислоты в зависимости от рН и ионной силы буфера. Процесс адсорбции основывается на следующих принципах: образование водородных связей с гидрофильной матрицей в хаотропных условиях, с последующим ионным обменом в жидкой среде с помощью анионообменника посредством отбора молекул по их аффинности и размеру. В большинстве случаев твердофазная экстракция осуществляется с использованием колонки для очистки ДНК, через которую проходит лизат под воздействием центробежной силы. По сравнению с традиционными способами очистки данный метод имеет преимущество в скорости работы.

Основой для большинства наборов для выделения и очистки нуклеиновых кислот, являются уникальные свойства силиконовых носителей для селективного связывания НК. К таким относятся стеклянные шарики и микроволокна, силикатные частицы, а также диатомит. Сюда же можно отнести носители из гидроокиси кремния. ДНК связывается с неорганическим носителем и высвобождается при элюции. Принцип очистки нуклеиновых