

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

кислот с помощью силикатных носителей базируется на высокой афинности отрицательно заряженного остова ДНК к положительно заряженным силикатным частицам.

Мы разработали буфер позволяющий, после инкубации с которым, восстанавливать связывающую способность колонки несколько раз, и что не менее важно сохранять выход НК и избежать контаминации.

Чтобы подтвердить отсутствие контаминирующих агентов после восстановления колонки и способность связывания новой НК с колонкой мы использовали методы спектрофотометрии, флюориметрии, ПЦР-РВ. Процедура восстановления колонки не предназначена для использования в клинической диагностике заболеваний, однако позволяет использовать коммерческие наборы вторично для прикладных исследований, что существенно удешевляет их стоимость.

В работе исследовались коммерческие наборы, в которых сепарация НК основана на принципе адсорбции на силикатном носителе. В качестве исследуемого материала была взята кровь КРС, из которой выделяли ДНК согласно инструкции к набору. Протокол твердофазной экстракции включает четыре ключевых шага: клеточный лизис; адсорбцию нуклеиновых кислот, отмывку и элюцию. Исходным этапом является установка колонки для адсорбции образца. Подготовка колонки производится с использованием буфера с определенным рН – для того, чтобы придать поверхностным структурам (или функциональным группам) сорбента необходимые свойства – только в таком случае ДНК или РНК будут осаждаться на носитель. Следующий шаг – образец, расщепленный с помощью лизирующего буфера, помещают на колонку. Искомая нуклеиновая кислота адсорбируется на колонке за счет высокого рН и концентрации солей в связывающем растворе – binding solution. Прочие составляющие, такие как белки, также могут образовывать прочные специфические соединения с поверхностью колонки. Эти нежелательные примеси можно удалить на стадии промывания, используя промывочный буфер – wash buffer, который содержит вещества, не дающие им адсорбироваться. Для того, чтобы высвободить нуклеиновую кислоту с колонки на стадии элюции, используется ТЕ-буфер или MQ-вода.

Регенерация колонок происходит после 1 кратного использования разработанного нами реагента. Однако предварительно колонка должна быть подготовлена с помощью 4-х кратного пропускания через неё дистиллированной воды центрифугированием при комнатной температуре. Объем используемой реагента и дистиллированной воды соответствует вместительности самой колонки. Инкубация подготовленной колонки с реагентом составляет 16 часов после чего реагент необходимо удалить с колонки центрифугированием. После чего необходимо 4 раза пропустить дистиллированную воду через колонку.

Качество образцов проверяли методами флюориметрии и спектрофотометрии и ПЦР-РВ. Качество материала для анализа должно

удовлетворять следующим требованиям: концентрация ДНК 50 нг/мкл, соотношение частот длин волн 260/280 в пределах 1,8.

Измерение концентрации ДНК на спектрофотометре NanoPhotometr NP80 проводили с помощью сравнения оптической плотности чистого элюирующего буфера и раствора ДНК в элюирующем буфере. 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. Измерение концентрации ДНК на флуориметре Quantus проводили с помощью сравнения смеси красящего буфера с 2 мкл раствора ДНК и 200 мкл красящего буфера. ПЦР-РВ проводили с помощью детектирующего прибора CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System с использованием набора реагентов для обнаружения ДНК крупного рогатого скота «Bovinae Ident RT», согласно инструкции к набору.

Для подтверждения отсутствия возможной контаминации после восстановления колонки с помощью реагента были проведены смывы с новых колонок и с восстановленных в трёхкратной повторности. Смывы подвергли анализу с помощью методов детекции НК таких как спектрофотометрия, флуориметрия, ПЦР-РВ.

По результатам спектрофотометрии (табл. 1) можно сделать вывод, что смывы с восстановленных колонок соответствует смывам с новых колонок по всем параметрам. Сотые и тысячные доли числовых значений, указанные в результатах, являются погрешностью инструмента и допустимы.

Таблица 1

**Результаты спектрофотометрии смывов с колонок**

Повторность	Смыв с новой колонки		Смыв с регенерированной колонки	
	Концентрация, нг/мк	260/280	Концентрация, нг/мк	260/280
1	0,01	-0,12	0,00	-0,13
2	0,03	0,06	0,00	-0,12
3	0,01	0,04	0,15	0,18

Результаты флуориметрии (табл. 2) показывают отсутствие ДНК во всех исследуемых смывах. Что говорит об удалении ДНК после восстановления колонок.

Таблица 2

**Результаты флуориметрии смывов с колонок**

Повторность	Смыв с новой колонки	Смыв с регенерированной колонки
	Концентрация, нг/мк	Концентрация, нг/мк
1	0,00	0,00
2	0,00	0,00
3	0,00	0,00

В таблице 3 представлены результаты ПЦР-РВ с указанием  $C_q$  – цикла, на котором прибором фиксируется логарифмический рост флуорисценции. Канал

флюорисценции FAM определяет наличие ДНК КРС в образце, канал флюорисценции HEX определяет прохождение внутреннего положительного контроля реакции. Согласно методическим указания к набору, если значения Cq по каналу FAM менее 35, то это означает наличие ДНК, если более 35 или флюорисценция не обнаружена (N/A), то в образце нет ДНК КРС. Для канала HEX если значения Cq по каналу FAM менее 35, то это означает нормальное прохождение внутреннего положительного контроля и реакция ПЦР не ингибирована, если более 35 или флюоресценция не обнаружена (N/A), то в образце идёт ингибирование реакции ПЦР.

Согласно результатам, во всех исследуемых образцах не обнаружена ДНК КРС, а сама ПЦР прошла нормально. Результаты положительного и отрицательных контролей также соответствует норме.

Таблица 3

### Результаты ПЦР-РВ смывов с колонок

Повторность	Канал флюорисценции	Смыв с новой колонки	Смыв с регенерированной колонки
		Cq	Cq
1	FAM	N/A	N/A
	HEX	30,81	30,64
2	FAM	N/A	N/A
	HEX	30,26	30,87
3	FAM	N/A	N/A
	HEX	30,45	30,71
Положительный контроль	FAM	24,1	24,16
	HEX	32,14	32,02
Отрицательный контроль	FAM	N/A	N/A
	HEX	32,54	32,66

Совокупность всех полученных результатов позволяет сделать вывод об отсутствии возможности для контаминации при использовании восстановленных колонок вторично.

Для подтверждения восстановления связывающей способности силикатного носителя колонки после регенерации было выделено ДНК КРС на новых колонках и на восстановленных в трёхкратной повторности. Образцы подвергли анализу с помощью методов детекции НК таких как спектрофотометрия, флюориметрия, ПЦР-РВ.

По результатам спектрофотометрии (табл. 4) можно сделать вывод, что качество образцов выделенных на восстановленных колонок соответствует качеству образцов, выделенных на новых колонок.

Таблица 4

### Результаты спектрофотометрии образцов ДНК, выделенных с помощью колонок

Повторность	Новая колонка		Регенерированная колонка	
	Концентрация, нг/мк	260/280	Концентрация, нг/мк	260/280

1	74,56	1,78	70,45	1,79
2	65,29	1,79	64,72	1,80
3	69,37	1,79	62,24	1,79

Результаты флюориметрии (табл. 5) показывают наличие ДНК КРС во всех исследуемых образцах.

Таблица 5

**Результаты флюориметрии образцов ДНК, выделенных с помощью колонок**

Повторность	Новая колонка	Регенерированная колонка
	Концентрация, нг/мк	Концентрация, нг/мк
1	61,56	59,55
2	54,41	52,06
3	56,23	53,67

При сравнении результатов измерений флюориметрии и спектрофотометрии обнаружена разница в концентрации ДНК между образцами, выделенными на чистых колонках и на восстановленных колонках в 4%.

В таблице 6 представлены результаты ПЦР-РВ образцов ДНК. Согласно им, во всех исследуемых образцах обнаружена ДНК КРС и сама ПЦР прошла нормально. Результаты положительного и отрицательных контролей также соответствует норме.

Таблица 6

**Результаты ПЦР-РВ образцов ДНК, выделенных с помощью колонок**

Повторность	Канал флуоресценции	Новая колонка	Регенерированная колонка
		C <sub>q</sub>	C <sub>q</sub>
1	FAM	24,26	24,84
	HEX	30,84	30,57
2	FAM	25,91	26,07
	HEX	30,46	30,84
3	FAM	25,61	25,93
	HEX	30,78	30,63
Положительный контроль	FAM	25,41	25,67
	HEX	31,16	32,45
Отрицательный контроль	FAM	N/A	N/A
	HEX	32,71	32,22

Совокупность всех полученных результатов позволяет сделать вывод об восстановлении связывающей способности колонок без существенных потерь выхода ДНК.

Таким образом, разработанный нами реагент позволяет просто и эффективно восстановить связывающую способность колонки без риска контаминации. Воспользоваться одной колонкой можно несколько раз, и лимитирующим фактором использования коммерческого набора останется

ограничения в реагентах, которыми комплектуются наборы с избытком. Используя реагент для восстановления колонок можно существенно снизить себестоимость работ по выделению НК.

### Библиографический список

1. Siddappa N. B. et al. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination //BioTechniques. – 2007. – Т. 42. – №. 2. – С. 186-192. Cady N. C., Stelick S., Batt C. A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures //Biosensors and Bioelectronics. – 2003. – Т. 19. – №. 1. – С. 59-66.
2. Антонова О. С. и др. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) //Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20. – №. 1.
3. Lee H. Y. et al. Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns //Forensic Science International: Genetics. – 2010. – Т. 4. – №. 5. – С. 275-280.
4. Stormer M., Kleesiek K., Dreier J. High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultrasensitive detection of bacteria in blood components //Clinical chemistry. – 2007. – Т. 53. – №. 1. – С. 104-110.

УДК 581.19:631.52:633.112.1

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОРТОВ ОВСА ПОСЕВНОГО ЗАПАДНО-СИБИРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

*Мамаева Виктория Сергеевна, стажер-исследователь, лаборатории геномных исследований в растениеводстве НИИСХ Северного Зауралья - филиал ТюмНЦ СО РАН, mamaeva.vs.b23@ati.gausz.ru*

*Таутекенова Азия Кайсаровна, стажер-исследователь, лаборатории геномных исследований в растениеводстве НИИСХ Северного Зауралья - филиал ТюмНЦ СО РАН, atautekenova@gmail.com*

*Аннотация:* Изучены сорта овса посевного Западно-Сибирской селекции методом электрофореза проламинов. Установлено, что генетическое разнообразие популяции сортов по авенин-кодирующим локусам характеризуются высоким значением (0,82). Это свидетельствует об отсутствии процессов генетической эрозии и говорит о грамотно организованной селекционной работе с культурой в регионе.

*Ключевые слова:* овес посевной, генетическое разнообразие, электрофорез, авенин-кодирующие локусы.

### Введение

Овес посевной (*Avena sativa* L.) относится к злаковой культуре. Представляет собой большую ценность для производства продуктов питания, а