

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

КАФЕДРА «БИОТЕХНОЛОГИЯ»

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

к выпускной квалификационной работе на тему:

**ИЗУЧЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ
(НАУЧНАЯ РАБОТА)**

Студент группы 32-09

Матчанова Дурдона Шапуровна

Руководитель ВКР

к.т.н. стар.преп. Максумова Д.К.

ВКР рассмотрен на кафедре
«БИОТЕХНОЛОГИИ» и рекомендован
к защите.

Заведующий кафедрой доцент
Хўжамшукуров Н.А.

Протокол № ___ от. 04.06.2013г.

ТАШКЕНТ-2013

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	4
1. Глава	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1.	Создание ДНК банков.....	5
1.2.	Особенности выделения ДНК из растительных объектов	8
1.3.	Получение индивидуальных генов и их фрагментов.	16
1.3.1.	Альтернативные методы.....	17
2. Глава	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1.	Выделение ДНК методом СТАВ.....	19
3. Глава	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	23
3.1.	Выделения ДНК из растительных объектов.....	23
3.2.	Примеры модификации методов выделения ДНК.....	27
3.2.1.	Высокое содержание полисахаридов и полифенолов.....	28
3.3.	Протокол выделения ядерной ДНК	33
3.4.	Выделение ДНК из обезвоженных (дегидрированных тканей).....	37
3.5.	Гербарный материал.....	39
4.	ВЫВОДЫ.....	48
5.	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	49

Введение

Для чего может служить образец ДНК? В зависимости от использования полученного образца выбирают ту или иную методику выделения. Цели использования могут быть очень разнообразны. Будь то фундаментальные исследования по систематическому положению организмов или же прикладное направление науки - генная инженерия, диагностика заболеваний, определение ГМО и другое.

И в каждом из вышеупомянутых целей должна быть применен как можно очищенный образец. Следует упомянуть огромное разнообразие живых организмов, из клеток которых потенциально можно выделить ДНК, хотя бы для создания банка геномов.

Наши исследования связаны с геномом растений.

Выделение ДНК многих видов растений считается трудной задачей из-за высокой концентрации вторичных метаболитов, таких как полисахариды и полифенолы. Существует несколько методик для решения этой проблемы, также разработаны коммерческие наборы. В данном исследовании проведен анализ существующих методик по выделению ДНК из растений и выделению растительной ДНК.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Исследования на уровне ДНК, и не только в молекулярной биологии, стали уже обычной практикой в селекции, таксономии, оценке и сохранении биоразнообразия, эволюции, изучении генетических основ регуляции физиологических процессов и устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды, биотехнологии, биоинженерии и др.

1.1. Создание ДНК банков.

Современный уровень молекулярно-генетических подходов: генотипирование, секвенирование и др. – позволяет анализировать огромное количество растительных организмов с целью выявления полиморфизма, молекулярных основ фенотипической изменчивости и устойчивости к стрессовым факторам среды и др. ДНК баркодирование, использующее секвенирование стандартных участков ДНК, особенно митохондрий и хлоропластов, все более широко используется для молекулярной систематики организмов. Создаются банки ДНК, которые интегрируются с существующими гербарными коллекциями, банками семян, коллекциями растений в ботанических садах [1].

ДНК банки – это хранилища образцов ДНК, например, сельскохозяйственных растений и их диких сородичей, которые используются для научных исследований с целью выявления генов интереса более продуктивных и более адаптивных к внешним факторам среды сельскохозяйственных культур. ДНК банки являются одним из источников создания Генбанков. Так, например, ДНК банк Королевских ботанических садов Великобритании (The RBG Kew DNA Bank) к началу 2010 г. уже содержал коллекцию из 40 тыс. образцов. Организация включает более 30 коллабораторов Великобритании, около 10 европейских и около 40 международных региональных участников.

Национальный ДНК банк Японии (NIAS DNA Bank) включает коллекции ДНК важных для сельского хозяйства организмов, в том числе культурных

сортов и диких видов риса и видов рыб. Австралийский ДНК банк (The Australian Plant DNA Bank) основан для целей длительного хранения и архивирования национального природного наследия, он содержит объемлющую коллекцию ДНК как собственно австралийских, так и важных мировых сельскохозяйственных культур, а также ДНК коллекцию трансгенных организмов. Банк ДНК в Берлине (The Berlin-Dahlem DNA Bank), являясь частью Сети ДНК банков (DNA Bank Network), в которую входит также и США, помимо животных и микроорганизмов, содержит коллекцию ДНК диких видов растений.

Главная преследуемая ученым цель – повышение международного уровня исследований в области таксономии и эволюции. ДНК банки содержат также образцы редких, исчезающих и эндемичных растений, что важно для сохранения мирового разнообразия растительных организмов. Все ДНК банки сопровождаются описанием создаваемых коллекций, процедур выделения ДНК, ее хранения, управления базами данных и процедур обмена.

Уже более чем для 10 тыс. видов определено количественное содержание ДНК в клетках растениях. Как правило, размер генома, это содержание ДНК ядерной гаметы, выражаемое как ('C-values'), или в единицах массы (пикограммах, 1 пг равен 10^{-12} г) или количеством пар нуклеотидных оснований (по, Мегаоснований, Мо равно 10^6 оснований), 1 пг=978 Мо. Высшие растения по сравнению с другими живыми организмами обладают самым большим геномом от 4×10^8 до 1×10^{11} пар оснований, по сравнению, например, с клетками человека, имеющими 3×10^9 пар оснований.

Эукариотические организмы, в том числе растения, помимо ДНК ядра, содержат нуклеиновые кислоты в митохондриях, хлоропластах, во внехромосомных плаزمиде, эписомальных вирусах, рибосомальную и другие типы РНК. Анализ 23 видов высших растений показал, что 2С содержание ядерного генома варьировало между 1,7 and 98 пг. Очевидно, что относительно небольшой размер ядерного генома, например, таких растений

как рис, плодово-ягодные, например, абрикос, персик, вишня, манго, папайя и др. облегчает молекулярные исследования этих видов полезных растений.

Одним из необходимых условий всех упомянутых выше исследований является работа с большим количеством образцов изолированной чистой ДНК. Хотя выделение ДНК уже является обычной процедурой и разработаны протоколы для большого количества видов растений, различных растительных тканей и органов, решение проблемы экстракции чистой недеградированной ДНК из растительных объектов все еще остается определяющим первым этапом в любой сфере использования молекулярно-генетических подходов для изучения растительных организмов.

1.2. Особенности выделения ДНК из растительных объектов.

В основе выделения ДНК лежат как физические, так и химические процессы. Чтобы экстрагировать ДНК из растительных объектов требуется избавиться от клеточных ферментов и «удалить» запасные вещества, например, полисахариды а также вторичные метаболиты, (алкалоиды, фенольные соединения, терпены), которые мешают изолированию ДНК, и отрицательно влияют на ее качество. Определенные группы полисахаридов при выделении ДНК образуют с ней вязкую желеподобную единообразную массу. Серьезное повреждающее воздействие оказывают окислители различной биохимической природы, в том числе фенольные соединения. [2]

Различающийся состав метаболитов представителей различных таксонов, а иногда даже представителей одного рода растений, требует индивидуального протокола изолирования ДНК.

В целом, процедура выделения ДНК включает обязательные процедуры:

- разрушение клеток;
- удаление мембранных липидов;
- удаление вторичных метаболитов и запасных веществ;
- удаление белков;
- удаление РНК;
- осаждение ДНК.

Первый этап – разрушение клеток, лизис, обязателен в связи с тем, что растительные клетки окружены прочной целлюлозной клеточной стенкой. Физическая гомогенизация тканей должна разрушить клеточные стенки и нарушить целостность клеток и внутриклеточных компонентов с целью освобождения этих компонентов, выделения их в экстракционный буфер. Физическое разрушение тканей осуществляется или растиранием в ступке, либо с использованием микродробилки или блендера.

Растительные ткани содержат большое количество полисахаридов, в том числе целлюлозу клеточных стенок, крахмал; полисахариды в комплексе с белками; белки в комплексе с липидами, комплексы белков с нуклеиновыми

кислотами, полифенолы и другие вторичные метаболиты, это существенно затрудняет изолирование ДНК из многокомпонентной смеси, элементы которой могут как физически связывать, так и химически деградировать молекулы нуклеиновой кислоты. Погружение тканей в жидкий азот с последующей гомогенизацией облегчает разрушение клеток, тормозя при этом любые биохимические и физические процессы, повреждающие ДНК. Если исходная ткань была заморожена, при гомогенизации в буфере не следует допускать таяния замороженной ткани.

Гомогенизация тканей в присутствии детергентов (поверхностно активных веществ), способствует высвобождению мембранных липидов, белков и лизису клеток. Выбор детергентов зависит от целей исследования. Анионные детергенты, например (SDS, SLS, sarkosyl), в буферных растворах дезорганизуют двухслойные липидные образования мембран, разрушают нековалентные связи и солюбилизируют (переводят в растворимое состояние) белки, тем самым разрушаются липидно-белковые комплексы мембран, в том числе ядерных, при этом ДНК экстрагируется в буфер, т.е. переходит в растворимое состояние. Реже используются неионные детергенты, такие как Triton X-100, но так как они более «мягкие», белки могут оставаться интактными, функциональными. Классический катионный сурфактант, используемый при экстракции ДНК, цетилтриметил бромид аммония (СТАВ) лизирует клеточную стенку. Додецилсульфат натрия (SDS), а также меркаптоэтанол, (концентрации которых могут варьировать) осаждают белки и полисахариды как нерастворимый комплекс. Меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и четвертичной структуры и действует как биологический антиоксидант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК. Поскольку наличие дисульфидных мостиков поддерживает стабильность нуклеаз, меркаптоэтанол элиминирует активность этих, освобождаемых при лизисе клеток, ферментов. Буфер экстракции может содержать дитиотрейтол (DTT), который также как и меркаптоэтанол является

сильным редуцирующим (восстанавливающим) агентом. В качестве антиоксиданта используется также аскорбиновая кислота. Присутствие ДТТ способствует разрушению дисульфидных связей, предотвращая образование димеров «тиолированной» ДНК в растворе. Однако даже ДТТ не может восстановить скрытые (недоступные раствору) дисульфидные связи. Высокие температуры, присутствие 6М гуанидингидрохлорида, 8М мочевины или 1% СДС способствуют этому восстановлению. Следует учитывать, что ДТТ окисляется на воздухе, поэтому его хранят при -20°C и в инертной атмосфере.

Нагревание и детергенты, присутствующие в буфере экстракции, такие как соли, денатурируют макромолекулы, нарушая водородные связи, гидрофобные взаимодействия, силы Ван дер Ваальса. Высокие концентрации солей осаждают, например, полисахариды, которые в противном случае, могут образовывать с ДНК желеобразный комплекс.

В присутствии в буфере экстракции ЭДТА, хелатирующего агента, связывающего ионы металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} и др.), происходит дезактивация металл-зависимых ферментов, находящихся в растительных экстрактах, в том числе нуклеаз, разрушающих ДНК.

Растительные объекты характеризуются накоплением в определенных органах, частях растений большого количества вторичных метаболитов (в первую очередь это относится к ароматическим и лекарственным растениям), которые оказывают существенное негативное влияние на процедуры изолирования и последующего использования ДНК. Так, полифенолы, присутствующие во многих растительных объектах, при гомогенизации тканей вступают в реакции окисления, ковалентно связываются с белками и нуклеиновыми кислотами, осадок ДНК становится коричневым, такие образцы ДНК непригодны для дальнейших исследований. Фенольные соединения могут ингибировать активность соответствующих ферментов в последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР). Содержащиеся в буфере экстракции полимеры поливинилпирролидон (PVP) или поливинилоливи-

нилпирролидон (PVPP, модификация PVP с поперечными сшивками) связываются с фенолами, мешая образованию их комплексов с ДНК.

Известно, что ДНК в клетке находится не только в ядерном компартменте, но в митохондриях и хлоропластах, и в каждом из компартментов ДНК связана с соответствующими высокоспецифичными белками. Так, степень связывания участков ядерной ДНК с белковыми комплексами зависит от транскрипционного статуса этих участков, транскрипционно неактивная ДНК наиболее плотно «упакована» с соответствующими белками, представляя структуру гетерохроматина.

Поэтому следующий важный этап – удаление белков с помощью протеаз. Щелочные протеазы гидролизуют белки, в том числе гистоны, связанные с ДНК, ферменты клеточного содержимого, в том числе нуклеазы. В качестве примера можно привести широко применяемую протеиназу К, которая эффективно инактивирует нуклеазы, будучи устойчивой при этом к денатурирующим (СДС, мочевины), хелатирующим (ЭДТА) и сульфгидрильным агентам, а также к ингибиторам трипсина и хемотрипсина. Данная протеаза работает в широком диапазоне рН (4-12). Более того, денатурирующие агенты повышают доступность пептидных связей белков для протеиназы К.

Белки также могут быть осаждены солями: ацетатом аммония, натрия, калия или до осаждения ДНК экстрагированы смесью фенол/хлороформ.

Большие количества РНК в образцах ДНК могут связывать Mg^{2+} и тем самым снижать активность ДНК полимеразы в ПЦР и, следовательно, количество продукта реакции. РНК может быть удалена на соответствующем этапе осаждением хлоридом лития, или добавлением РНКазы к растворенному в воде осадку нуклеиновых кислот. Инкубация при 37°C способствует гидролизу РНК в образцах. Затем ДНК должна быть осаждена и переосаждена спиртом, так как мелкие фрагменты РНК после обработки РНКазой могут послужить «затравками» в ПЦР реакции.

Нуклеиновые кислоты из экстракционного буфера зачастую осаждают охлажденным во льду этанолом или изопропанолом, поскольку полярные молекулы ДНК нерастворимы в неполярном спирте. Следует помнить, что концентрация спирта при переосаждении не должна быть меньше 70% во избежание потерь ДНК.

Если в осажденном концентрированном экстракте ДНК все еще присутствуют ингибиторы ПЦР, может быть использована смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт; при этом смесь разделяется на фазы: водный раствор, в котором содержатся нуклеиновые кислоты, в интерфазе вода/фенол содержатся белки и углеводы, липиды растворяются в фазе хлороформ/изоамиловый спирт. Водный экстракт переносится в чистую пробирку, и нуклеиновая кислота может быть осаждена 3М ацетатом натрия, с последующим промыванием осадка в спирте (100%, 70% этанол). К сожалению, фенол, хлороформ и изоамиловый спирт – токсичные соединения и требуют утилизации после использования, поэтому их применение становится все менее привлекательным. Коммерческие наборы для выделения ДНК не содержат токсичные фенол и хлороформ, но при выделении ДНК из большого количества образцов лимитирующим фактором оказывается стоимость.

Для облегчения процедуры отделения ДНК от вторичных метаболитов часто применяются процедуры очистки с помощью силиконового матрикса или ионообменной хроматографии. Силиконовый матрикс связывает ДНК в присутствии высоких концентраций хаотропных солей, таких как гуанидингидрохлорид, которые разрушают гидрофобные взаимодействия. По определению исследователей, метод имеет два преимущества: дешевизна силикон диоксида и универсальность протокола для широкого приложения для очистки ДНК из растительных объектов [3]. Процедура от гомогенизации ткани до элюции геномной ДНК занимает немного более получаса. ДНК или продукты рестрикции из ПЦР смеси освобождаются на 70-80% в зависимости от размеров фрагментов, продукты с агарозного геля – до 68%. Но очистку

небольших ДНК фрагментов <50 пар оснований осуществить не удастся, поскольку эти фрагменты прочно связываются с матриксом, не элюируются и не осаждаются в смеси этанол/изопропанол. Один мгл силикон диоксида способен связать до 3-4,5 мкг ДНК и в таком состоянии стабильность ДНК сохраняется до 12 месяцев. Очевидно, что количество используемого силикагеля зависит от предполагаемого количества ДНК в исходном материале; ДНК отделяется от силикагеля при понижении концентрации соли, а также быстрым центрифугированием (10 сек.); либо ДНК может быть отмыта небольшим объемом (от 5 мкл) воды, облегчить элюцию можно нагреванием. Предлагаемый метод прост, быстр и экономичен, не требует специальных колонок и оборудования, что делает его привлекательным при большом объеме образцов в экспериментах. Силикагель включается во многие коммерческие наборы (Kits) экстракции ДНК. Тем не менее, метод имеет и определенные недостатки.

Ионообменная хроматография осуществляется с помощью связывания положительно заряженной смолы в колонке с негативно заряженными ДНК и РНК. Элюция с матрикса проводится понижением концентрации соли. Протеины и РНК при низких концентрациях соли легко отделяются от матрикса, в то время как ДНК более прочно связана с носителем и элюируется при более низких концентрациях. Количество носителя и молярность соли зависят от целей эксперимента. Основным недостатком хроматографии является стоимость, тем не менее, данный метод незаменим в диагностических целях, так как позволяет получить очень чистые препараты ДНК.

Поскольку геномная ДНК является очень длинной полимерной цепью, в процессе ее выделения необходимо избегать чрезмерного пипетирования и грубого встряхивания.

Количество и качество выделенной ДНК может быть определено по соотношению поглощения при длинах волн 260/280 нм. Оптимальный показатель – 1,8-1,9. Его снижение указывает на белковое и фенольное загрязнение, поскольку эти соединения имеют максимум поглощения при 280

нм. Образцы РНК имеют отношение 1,9–2,0. Перед измерением проб необходимо калибровать спектрофотометр по отношению к раствору, (не содержащему ДНК), в котором ДНК ресуспендирована. Измерения лучше проводить в (TE) буфере, так как измерения в воде приводят к заниженным результатам. На основе показаний спектрофотометра рассчитывается общее количество выделенной ДНК из единицы массы исходного образца. Затем образцы ДНК прогоняются в агарозном геле и окрашиваются этидиум бромидом для визуализации. При деградации ДНК на электрофореграмме, помимо полосы основного высокомолекулярного продукта (целая молекула ДНК), можно увидеть размазанное пятно (smear). Качество и количество ДНК можно оценить также с помощью флуорометра либо в Real-time PCR. Но данные процедуры ограничиваются дорогостоящим оборудованием и реагентами.

ДНК после экстракции может храниться в буферах, совместимых с ПЦР. Но следует учитывать, что, например, (TE) буфер содержит ЭДТА, связывающий ионы магния, необходимого для работы ДНК полимеразы. В стерильной дистиллированной воде ДНК представляет собой слабую кислоту, что в конечном итоге приводит к авторазрушению. Фосфатные буферы также могут влиять на структуру ДНК. Трис-буфер сам по себе не оказывает влияния на Taq полимеразу, но при внесении ДНК в этот стабилизирующий буфер может сдвинуться рН реакционной смеси ПЦР. Экстрагированная ДНК может долгое время храниться при -80°C . Для непродолжительного хранения ДНК достаточно температуры 4°C . Крайне не рекомендуется неоднократное замораживание-оттаивание препаратов ДНК вследствие разрывов молекулы.

Желательно, чтобы метод экстракции ДНК был достаточно простым, удобным, недорогим и при этом воспроизводимым. Полученная чистая ДНК должна быть «доступна» для ферментов рестрикции и реакций амплификации, отвечать требованиям последующего клонирования, секвенирования, гибридизации и др. Решающее значение чистота выделенной ДНК имеет также при выявлении генетически модифицированной составляющей в

сельскохозяйственной продукции, продуктах питания и кормах. Следует помнить, что превышающие определенный порог концентрации СТАВ, ЭДТА, этанола, изопропанола, декстран сульфата, ацетата натрия, хлорида натрия, фенола, липидов, полисахаридов, пектина и др. могут ингибировать ПЦР [4]. Препараты ДНК для ПЦР должны быть свободны от нуклеаз (которые деградируют как матричную, так и амплифицируемую ДНК); эндо- и экзопротеаз (которые способны инактивировать термостабильную ДНК-зависимую ДНК полимеразу); свободны от белков, стабилизирующих двойную геликс-структуру ДНК, предотвращающих «расплетание» ДНК, присоединение праймеров. Добавление в ПЦР диметилсульфоксида (DMSO) или бетаина дестабилизирует третичную и вторичную структуру ДНК. Но следует помнить, что различные ДНК-зависимые ДНК полимеразы могут в различной степени ингибироваться теми или иными компонентами реакционных смесей полимеразной реакции.

Определено, что ДНК более устойчива в условиях технологического процесса, чем химические соединения. Это очень эффективно используется, например в диагностике продуктов питания. Прогресс в освоении методов ДНК диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В последние годы принцип специфической ДНК-амплификации начали активно применять при разработке методов достоверного определения видовой принадлежности растительного сырья и многокомпонентных продуктов. На начальном этапе выделения ДНК из клеток растений требуется эффективное разрушение клеточных стенок.

На следующем этапе важно провести очистку освободившейся высокомолекулярной ДНК от многочисленных примесей, присутствующих в растительном экстракте – полисахаридов, белков, липидов, пигментов и других. Поэтому возникает необходимость выбора метода под новый объект экспериментальным путем.

1.3. Получение индивидуальных генов и их фрагментов.

Выделение генов из ДНК: изолированную ДНК подвергают фрагментации. Для этого используют ферменты - рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы), катализирующие расщепление ДНК на участках, имеющих определенные последовательности нуклеотидов (обычно длиной в 4-7 нуклеотидных пар). Расщепление может происходить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар, и тогда обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты имеют двунитевые (тупые) концы. Другие рестриктазы расщепляют нити ДНК со сдвигом, образуется ступенька – одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов. Образуются одностебельные (липкие) концы. Если встречаются два липких фрагмента ДНК, полученных действием одной и той же рестриктазы, то они легко вступают во взаимодействие (по принципу комплементарности): При необходимости тупые концы могут быть превращены в липкие. Нуклеотидная последовательность с липкими концами может быть присоединена к вектору, предварительно обработанному той же рестриктазой или превращена из линейной молекулы в кольцевую путем сшивания взаимно комплементарных концов.

Однако данный метод выделения генов из ДНК имеет недостатки:

1) Достаточно трудно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, который соответствует нужному гену. Наряду с интересующим геном фрагменты ДНК, как правило, включают лишние нуклеотидные последовательности, мешающие использованию гена. Рестриктаза может отщепить часть нуклеотидной последовательности гена, в результате ген теряет функциональную полноценность.

2) Гены эукариот имеют сложное строение: включают экзоны и интроны. Первичная РНК, синтезированная на такой ДНК-матрице, подвергается модификации (сплайсингу), в результате участки, соответствующие интронам, удаляются, а участки, соответствующие экзонам, соединяясь, образуют

зрелую матричную РНК. Наличие интронов является препятствием для нормального функционирования трансплантированных генов.

3) При обработке ДНК рестриктазами образуется смесь фрагментов. Выделить из нее фрагменты, несущие нужный ген – сложная задача. Бактериальная клетка содержит около 5 тыс. генов, а эукариотная клетка – от 10 до 200 тыс. генов.

1.3.1. Альтернативные методы.

Химико-ферментативный синтез генов. Данный метод является альтернативой «вырезанию» генов с помощью рестриктаз из нативной ДНК. Метод включает химический синтез коротких (8-16-звенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов.

Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов. Кроме того, существует возможность введения в гены участков узнавания различных рестриктаз, регуляторных последовательностей.

Применимость данного метода ограничена возможностями получения информации о нуклеотидной последовательности гена. Эта последовательность может быть воссоздана на основе первичной структуры соответствующего белка.

Методом химико-ферментативного синтеза получены гены соматостатина, А- и В-цепей инсулина, проинсулина и др.

в) Ферментативный синтез генов на основе выделенной из клетки м-РНК. Это наиболее широко распространенный метод синтеза генов. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК (комплементарная ДНК, кДНК) используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы.

Достоинством данного метода является то, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Кроме того, легче создать условия, когда клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК.

С помощью этого метода в 1979 г. был получен ген соматотропина (гормона роста человека).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. СТАВ-метод выделения ДНК из растений.

СОСТАВ СТАВ-буфера:

1. СТАВ 2% (10,0 г),
2. NaCl 1,4 М (40,91 г),
3. ЭДТА 20 мМ (20 мл 0,5 М ЭДТА),
4. Tris-HCl pH 8 - 100 мМ (50 мл 1М Tris-HCl) добавить дистиллированную воду до конечного объёма 500 мл,

TE-буфер: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА

Последовательность работы.

1. Примерно 2 см² листьев положить в 1,5 мл пробирку.
2. Добавить 400 мкл СТАВ 2%-буфера и быстро в течении 30 сек измельчить с помощью палочки-измельчителя.
3. Добавить 10 мкл РНКазы и 5 сек. встряхнуть на встряхивателе.
4. Инкубировать 60-80 мин при 65°C на водяной бане или сухом нагревателе, периодически аккуратно взбалтывать.
5. Добавить 400 мл очистительного раствора хлороформ-изоамиловый спирт (очистительный раствор: 92% хлороформа и 8% изоамилового спирта).
6. Центрифугировать 1 мин при максимальной скорости (13000 об/мин).
7. Осторожно пипеткой отобрать верхнюю фазу (постараться не захватить промежуточную пленку) и перенести в новую пробирку.
8. Повторить пункты 5-7.
9. Добавить 350 мл холодного изопропанола и тщательно перемешать растворы не допуская энергичного встряхивания.
10. Центрифугировать 10 мин при максимальной скорости (13000 об/мин).
11. Изопропанол аккуратно слить и осажденную ДНК прополоскать в 70% этаноле.
12. Центрифугировать 5 мин при максимальной скорости (13000 об/мин).

13. Спирт слить и ДНК оставить в открытой пробирке для сушки (часто достаточно около 1 часа).

14. Высохшую ДНК растворить в дистиллированной воде или для долгого хранения ДНК лучше растворить в ТЕ-буфере.

Ниже приведен данный протокол:

1. В пробирки Эппендорф внести по 750 мкл (2×СТАВ) буфер и 3 мкл 2-меркаптоэтанола.

2. Растереть 0,5-1,0 г ткани с жидким азотом и стерильным песком.

3. На кончике шпателя внести растертую ткань в каждую пробирку и хорошо перемешать.

4. Инкубировать в водяной бане при 55-60°C в течение 1–5 часов, перемешивая каждые 15 мин.

5. Добавить 700 мкл (SEVAG = хлороформ/изоамиловый спирт 24/1) в каждую пробирку и тщательно перемешать, отцентрифугировать при 9240 g 10-15 мин. Перенести водную фазу в новую пробирку Эппендорф.

6. Добавить 0,33 объема ледяного изопропанола и оставить не меньше, чем на час при -30°C.

7. Отцентрифугировать при 9,240–13,305 g 10 мин. при комнатной температуре. Супернатант отбросить, не нарушая осадка. Высушить в вакууме. Если водная фаза вязкая, повторить 6-й и 7-й этапы от 2-х до 4-х раз.

8. Ресуспендировать осадок в 100–200 мкл (ТЕ). Добавить 1-2 мкл 10 мг/мл РНКазы. Хорошо перемешать и инкубировать 30 мин. при 37°C.

9. Добавить 20 мкл (0,1 объема) 2,5 М (NaOAc) и 500 мкл (2-2,5 объема) ледяного 95% этанола и оставить при -20°C не меньше, чем на 30 мин. Отцентрифугировать при 9,240–13,305 g 5 мин. Отбросить супернатант.

10. Промыть осадок 1 мл 70%-ного этанола, не нарушая осадка. Отцентрифугировать при 9,204 g 4 мин. и слить этанол. Высушить осадок в вакууме. Не пересушить.

11. Ресуспендировать осадок в ~100-200 мкл (ТЕ). Хранить при -20°C.

12. Проверить ДНК в 1%-ном агарозном геле.

(цетилтриметиламониум бромид); 140 мл 5 М NaCl; 25 мл 2 М Tris-HCl (pH 8); 20 мл 0.5 М EDTA

(pH 8). Доводим до объема в 500 мл чистой водой и проавтоклавировать.

Научный журнал КубГАУ, №60(06), 2010 года

Состав реактивов:

2x CTAB

- 100mM Tris pH-8.0
- 20mM EDTA pH-8.0
- 1.4M NaCl
- 2% CTAB
- Autoclave

300ml

- 1M Tris pH-8.0 30ml
- 0.5M EDTA pH-8.0 12ml
- NaCl 24.5448 g
- CTAB 6g

10 x CTAB(CTAB/NaCl)

- 0.7M NaCl
- 10% CTAB
- Autoclave

100ml

- NaCl 4.1g
- CTAB 10g

CTAB precipitation solution

- 50mM Tris pH-8.0
- 10mM EDTA pH-8.0
- 1% CTAB
- Autoclave

100ml

- 1M Tris pH-8.0 5ml
- 0.5M EDTA pH-8.0 2ml
- CTAB 1g

High salt TE

- 10mM Tris pH-8.0
- 0.1mM EDTA pH-8.0
- 1M

200ml

- 1M Tris pH-8.0 2ml
- 0.5 M EDTA pH-8.0 40µl
- NaCl 11.68g

6M NaOH- 1 Liter

240g NaOH

Fill to 1 L with dH₂O.

0.5 M EDTA pH 8 (autoclaved)

- 700 ml dH₂O 20% CTAB
- Add Na₂EDTA2H₂O 186.1g
- Add 10N Na OH until pH=8.0
- Add dH₂O up to 1liter

TE

- 10mM Tris
- 1mM EDTA

50ml

- 0.5ml 1M Tris pH 8.0
- 0.1ml 0.5M EDTA pH 8.0

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выделения ДНК из растительных объектов.

Как было представлено в обзоре литературы, выделение ДНК начинают с разрушения тканей. Разрушение клеток обычно проводят механическим путем в водных растворах в присутствии детергентов, растворяющих клеточные мембраны, и хелатирующих агентов, подавляющих нуклеазную активность. Для очистки от белковых примесей используют экстракцию фенолом или депротеинизируют препараты ДНК с помощью протеиназы. Процедура дальнейшей очистки препарата в большей степени зависит от целей эксперимента. Концентрируют ДНК осаждением этанолом или изопропанолом. Для того, чтобы получить высокоочищенные ДНК, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения. Возможные примеси могут ингибировать проведение анализа с использованием ПЦР.

Неполное удаление ингибиторов, полисахаридов и полифенолов приводит к угнетению дальнейших ферментативных реакций в процессе ПЦР и вызывает деградацию ДНК после длительного хранения. Традиционные методы выделения ДНК, которые основываются на использовании этанола для осаждения ДНК, приводят к тому, что полисахариды выпадают в осадок совместно с ДНК. Поэтому исследователи предпочитают использовать фенол-хлороформные методы. Однако в этом случае качество выделяемого ДНК может быть не последовательным в связи с неполным удалением ингибиторов ПЦР.

Цель нашей работы: экспериментально установить условия высокопроизводительного метода выделения ДНК растений.

В наши задачи входили выбор и оценка способов экстракции ДНК и их апробация на различном материале. Для этого мы выбрали методику СТАБ для выделения ДНК:

3.1. Выделение ДНК методом СТАБ проводили по ниже следующему протоколу:

- 0.2 г. листьев хлопчатника помещали в предварительно простерилизованные и охлажденные ступки, добавляли жидкий азот и растирали до гомогенного порошка светло-зеленого цвета. Листья лучше всего измельчаются или растираются в замороженном виде.

- К гомогенату добавляли 2 мл подогретого до 65°C (при высокой температуре лучше идет выделение ДНК) 2хСТАБ (100мМ Трис, 20мМ ЭДТА, рН 8.0) буфера и размешивали стерильным шпателем. 2хСТАБ разрушает стенку клетки.

- 900 мкл суспензии переносили дозатором с обрезанным кончиком в стерильную 2 мл пробирку.

- Пробирки с образцами инкубировали 60 минут в водяной бане при 65°C, перемешивая каждые 5 минут. После инкубации к образцам добавляли в равном объеме (900 мкл) смесь хлороформ-изоамила в соотношении 1:1. Они помогают отделять ДНК от белков и других компонентов клетки; (стадии с применением хлороформа и изоамила проводили в вытяжном шкафу)

- Тщательно перемешивали содержимое пробирок на Вортексе и центрифугировали в центрифуге 20 минут при 10.000 об./мин. Чтобы отделить содержимое от ненужных нам консистенций. Внутри которых уходят выделенные белки и другие компоненты клетки.

- Осторожно отбирали 600 мкл верхней фазы (не захватывая интерфазу) и переносили в новую 2 мл пробирку. Именно на верхней фазе находятся очищаемая, выделяемая нами ДНК.

- Вносили 0.1 объема (60 мкл) горячего 10хСТАБ (0.7М NaCl, 10% СТАБ) буфера и тщательно перемешивали. Разница между 2хСТАБ и 10хСТАБ в том, что концентрация 10хСТАБ высокая. Она разрушает мембрану ядра, позволяя ДНК перейти в раствор.

- Добавляли в равном объеме (660 мкл) смесь хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешивали содержимое пробирок на Вортексе.

- Центрифугировали 20 минут при 12.000 об./мин., осторожно отбирали верхнюю фазу (500 мкл) и переносили в новую пробирку.

Эти процессы мы осуществляем во второй раз для лучшего очищения ДНК при выделении.

- Наливали в равном объеме (500 мкл), буфер для осаждения - СТАБ precipitation buffer (50мМ Трис, 10мМ ЭДТА, 1% СТАБ pH 8.0), перемешивали 5 минут и инкубировали при 65°C 30 минут. СТАБ precipitation buffer помогает осадить нуклеиновые кислоты. (СТАБ также денатурирует и раскрывает белки делая их более чувствительными для расщепления).

- Осаждали в центрифуге 15 минут при 12.000 об./мин., В мелком объёме на дне пробирки видно ДНК, осторожно сливали водную фазу.

- К осажденной ДНК добавляли высоко-солевой буфер - High Salt TE (10мМ Трис, 0.1М ЭДТА, pH8.0) в количестве 500мкл и тщательно перемешивали на термомиксере до ее полного растворения. High Salt TE мы использовали для растворения солей.

- К растворенной ДНК добавляли 0.6 объема изопропилового спирта (Isopropanol; 2-propanol), осторожно перемешивали 1-2 минуты и оставляли в морозильнике при $t = -20^{\circ}\text{C}$. на 1 час или на ночь. В этой стадии производится очистка образца ДНК с использованием соответствующего метода осаждения.

- ДНК осаждали центрифугированием в течение 20 минут (12.000 об./мин) при температуре +4°C, осторожно сливали изопропанол. Еще вместо изопропанола можно использовать этанол, он также хорошо осаждает ДНК, но изопропанол дешевле, чем этанол, Поэтому мы использовали изопропанол.

- Осажденную ДНК дважды промывали 70% спиртом в объеме 1мл и центрифугировали 5 минут при 12.000 об./мин., аккуратно отбирали спирт. Так как ДНК имеет гидрофильные свойства мы очистили его при помощи 70% спиртом.

- Осадок сушили в вакуумном концентраторе при температуре +37°C в течение 10-15 минут до полного испарения остатков спирта.

- Высушенную ДНК растворяли в 100 мкл ТЕ буфера (10мМ Трис рН 8.0, 1 мМ ЭДТА рН 8.0) или в 10мМ Трис рН=8.0. При сушке осадка ДНК необходимо не допустить, чтобы осадок высох полностью, так как это приводит к затруднению растворения в ТЕ-буфере. В ТЕ-буфере ДНК храниться на долгое время. ДНК можно растворить также и на дистиллированной воде, но его не возможно хранить долгое время.

- Определяли концентрацию электрофорезом и разводили до концентрации 50ng/ мкл. Для контроля ДНК при электрофорезе может быть использована ДНК бактериофага λ (48.5 т.п.н.) расщепленная ферментом рестрикции Hind III либо Pst I. Геномная ДНК распределяется в геле примерно на том же уровне, что и ДНК бактериофага. Для более точного определения концентрации ДНК образцы анализировали на спектрофотометре при длине волны 260 – 280 нм.

- Образцы ДНК хранили в ТЕ-буфере (10mM Tris рН7.5, 1mM EDTA рН8.0) при температуре -20°C.

3.2. Примеры модификации методов выделения ДНК.

Как упоминалось выше, различные виды растений, растения и органы на различных стадиях развития, даже различные органы одного вида на одной стадии развития растения содержат различные количества и классы вторичных метаболитов и запасных веществ. Компонентный состав оказывает значимое влияние на качество и количество экстрагируемой ДНК. В связи с этим существует достаточно много модификаций выделения ДНК из растительных объектов. Одним из наиболее широко применяемых является метод, разработанный [5] и основанный на использовании буфера СТАВ. Так, исследователи [6] цитируют одиннадцать модификаций данного метода, которые включают не только различные концентрации собственно буфера, но и добавление протеиназы К, меркаптоэтанола, использование смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1), и затем хлороформ/изоамиловый спирт (24:1) и др. для лучшей очистки ДНК.

3.2.1. Высокое содержание полисахаридов и полифенолов.

Известно, что исследователи предпочитают использовать для изолирования ДНК молодые органы растений, зачастую молодые листья, поскольку они содержат меньшие количества запасных веществ и вторичных метаболитов. Однако подобные образцы по ряду причин далеко не всегда доступны, и приходится модифицировать методы для получения удовлетворительных результатов из взрослых органов растений, гербарного материала и др.

Поскольку использование СТАВ и высоких концентраций солей не гарантирует полного избавления от полисахаридов, был предложен способ выделения ДНК из взрослых листьев с использованием для очистки колонки с Sephacryl S-1000 и последующим осаждением ДНК с (PEG 8000) [7]. Использование очищенной таким способом ДНК дало положительные результаты в ПЦР, рестрикции и (Southern-blot) анализе.

Суккулентные виды содержат очень большое количество слизеобразных веществ (желирующих полисахаридов), которые не позволяют отделить от них ДНК. Для представителя суккулентов *Sedum Telephium* разработан протокол, основанный на принципе осаждения одного компонента, тогда как другой остается в растворе. Это достигается ступенчатым повышением концентрации СТАВ, избирательно осаждающего ДНК (полисахариды остаются в растворе), позволяя получить осадок, свободный от полисахаридов [8]. К гомогенату замороженных в жидком азоте листьев первоначально добавляли 5 объемов буфера экстракции (100 mM Трис-НСl, pH 8,0; 20 mM Na₂ EDTA; 2% w/v СТАВ; 1,4 M NaCl; 1% w/v PVP). Процедура осаждения повторялась трижды с изменяющейся концентрацией буфера. Осадок растворялся в ТЭ-буфере с 1,0 M NaCl, осаждался в двух объемах этанола при низкой температуре и отмывался дважды 70%-ным спиртом. Осадок растворялся 0,2 объемами 12 M LiCl. Освобождение от РНК осуществлялось РНКазой. Однако, одним из недостатков данного метода является сравнительно низкий выход ДНК.

Одним из способов избавления от высоких концентраций полисахаридов может служить использование корней в качестве образцов для выделения ДНК, имеющих более низкую вязкость по сравнению с листьями, например, у кактусов [9]. Выделение ДНК из представителей родов кактусов *Hylocereus* и *Selenicereus* включало следующие основные стадии: трехкратное отмывание растертой ткани в буфере экстракции; экстракция в СТАВ буфере с высокой концентрацией соли (4М NaCl) для удаления остатков полисахаридов; удаление РНК с помощью РНКазы; экстракция фенолом/хлороформом для удаления белков; экстракция хлороформом для удаления остатков фенолов. Выход ДНК составлял от 0 до 20 мг/г свежих корней.

Для выделения ДНК из листьев нескольких видов винограда (*Vitis* spp.), яблони (*Malus* spp.), груши (*Pyrus* spp.) и хвойных (*Pinus densiflora*, *Pinus koraiensis*, *Taxus cuspidata*, *Juniperus chinensis*) был предложен метод, включающий три стадии. На начальном этапе листовая материал (несколько листовых дисков, что избавило от процедуры взвешивания и от возможной контаминации при взвешивании) растирали в пробирке в капле 1% (v/v) 2-меркаптоэтанола после чего добавляли 300 мкл буфера (250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 200 mM Tris-HCl, pH 8,0). Гомогенат инкубировали при комнатной температуре 1 час. На следующей стадии к гомогенату добавляли 5 мкл свежеприготовленного растворимого PVP в конечной концентрации 6% (soluble PVP, Sigma, MW 10 000), затем половину объема 7,5 М ацетата, инкубировали на льду 30 минут и центрифугировали 10 мин. при 10000 g, 4°C. Супернатант переносили в чистую пробирку, добавляли 1 объем изопропанола и осаждали ДНК 30 мин. при -20°C. После 10 мин. центрифугирования при 10000 g осадок ДНК высушивали в вакууме. После соответствующей очистки от РНК и пигментов показатель A260/A280 растворенных образцов ДНК был в пределах 1,8 [10].

Добавление 40 mM аскорбиновой кислоты при понижении pH экстрагирующего раствора в сочетании с меркаптоэтанолом предотвращало

окисление полифенолов и связывание с ДНК и тем самым повышало качество последней, показатель A260/A280 был около 1,8 [11].

Исследователями после безуспешных попыток выделения ДНК из лекарственного растения *Terminalia arjuna*, богатого таннинами, алкалоидами, терпенами и фенольными соединениями, при использовании различных модификаций СТАВ метода была добавлена стадия доочистки на колонках (Genelute plant genomic DNA extraction kit- G2N 70, Sigma Aldrich) [12]. Препарат ДНК, полученный таким способом, успешно был применен в исследовании генетического разнообразия популяции *Terminalia arjuna* в Индии.

Взрослые листья клубники содержат большое количество полисахаридов, фенольных соединений, в том числе их производных таннинов. Исследователями после неудачных попыток амплифицирования с использованием 8-ми протоколов экстракции, описанных в литературе, предложен собственный относительно быстрый, недорогой метод выделения ДНК из этих растительных образцов [13]. В работе использовали по 5-12 образцов нескольких культурных и диких видов рода *Fragaria*. Взрослые листья сразу после сбора фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C . Замороженные образцы растирали в центрифужных полипропиленовых пробирках и добавляли буфер экстракции (100 mM Tris, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8,0, 2% СТАВ, 0,3% меркаптоэтанол, 50 мг PVP/ 0,5 г ткани), инкубировали при 60°C 25-60 мин. ПВП образовывал комплекс с полифенолами, отделяя их от ДНК. Высокая концентрация соли способствовала удалению полисахаридов. Час обработки РНКазой был достаточен для дегградации РНК. Выделенная ДНК показала положительные результаты в (RAPD) реакции. Исследователи предполагают, что протокол можно использовать для других представителей семейства Rosaceae, содержащих высокие концентрации полисахаридов и полифенолов.

Экстракты растений подсолнечника также содержат высокие концентрации полифенолов, таннинов, полисахаридов. Испытав различные

методы экстракции ДНК, исследователи [14] внесли в процедуру значимый этап, сразу после гомогенизации образцов, замороженных при -80°C , отмывая их в течение 5 мин в буфере отмывания (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, 1 M NaCl; 1% 2-меркаптоэтанол; 1% PVP k-30, SABC_{abc}) во льду. После центрифугирования при 4°C верхний водный слой отбрасывался, а к остатку добавлялся буфер экстракции (2% СТАВ; 1,42 M NaCl; 200 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1% 2-меркаптоэтанол; 1% PVP), нагретый до 65°C . В результате дальнейших процедур выделения ДНК была исключительно чистой (260/280 нм в пределах 1,80-1,89) и успешно использовалась для рестрикции (EcoRI, HindII, BamHI), (RFLP) и других молекулярных исследований. Был сделан также вывод, что не следует использовать больше 200-300 мг образца для процедуры выделения, в противном случае избежать отрицательного действия полифенолов, полисахаридов и др. не удастся.

Очевидно, что все исследователи стремятся применять протокол для изоляции ДНК, позволяющий использовать листья разного возраста, воспроизводимый, не требующий больших затрат времени с минимизацией загрязнений выделяемой ДНК. Для решения данной задачи исследователи сравнили 5 протоколов (4 из них с использованием коммерческих наборов, 5-й – модификация СТАВ) для выделения РНК и ДНК из листьев *Quercus ilex*, содержащих большое количество фенолов и других метаболитов [15]. Листья были заморожены в жидком азоте и затем растирались вручную или с использованием криогенной мельницы (SPEX SamplePrep 6770 Freezer/Mill), причем вручную растертые образцы давали типичную для ДНК полосу при электрофорезе. Два протокола, основанные на очистке на силиконовой мембране, были наиболее подходящими для объекта исследований, оба протокола давали значимо лучшие результаты при использовании нерастворимого (PVPP) (260/280 нм – $1,84 \pm 0,075$), указывая на то, что полифенолы являлись основной проблемой для данного объекта. С использованием the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) были получены достаточные количества ДНК.

Одним из первых требований при картировании генов, селекции с использованием маркеров количественных признаков, изучении популяций, разработки стратегии сохранения видов является необходимость разработки и использования высокоэффективных с точки зрения качества, количества и себестоимости способах изолирования ДНК из очень большого количества образцов. Исследователями [16] были отработаны «автоматизированные» версии протокола на основе the Qiagen MagAttract Plant Kit в сравнении со СТАВ методом, способствующие изолированию ДНК и генотипированию тысяч образцов хвойных: представителей ряда видов сосны и ели. ДНК изолировали из высушенных на силикагеле и хранившихся при -20°C игл, причем отказавшись от взвешивания каждого образца, что отнимает значительное время. В каждую пробирку (96-racked) помещали 1-2 иголки, добавляли буфер и 5 мм стальной шарик, растирали с помощью (Mixer Mill), перемешивали и инкубировали при 65°C 15 мин. После соответствующих процедур, в том числе переосаждения этанолом, сравнивали полученные образцы ДНК с выделенной из свежих растительных образцов. Хотя СТАВ метод продемонстрировал лучший выход ДНК и воспроизводимость, при больших объемах образцов MagAttract протокол оказался более «гибким» и позволил обрабатывать одновременно большое количество образцов с хорошим выходом ДНК при стоимости одного образца 1\$. Высокоэффективная версия позволила обрабатывать до 200 образцов в день.

3.3. Протокол выделения ядерной ДНК.

Для целей последующего секвенирования генома был предложен протокол выделения ядерной ДНК, позволяющий минимизировать содержание хлоропластной и митохондриальной ДНК [17]. Поскольку наиболее используемый для выделения ДНК (СТАВ) метод не позволяет избавиться от ДНК клеточных органелл, исследователи оптимизировали метод выделения ДНК из изолированных клеточных ядер, используя девять представителей различных семейств растений. Для выделения ядерной ДНК были использованы три протокола: для образцов с небольшим количеством исходного материала, образцов с высоким содержанием ДНКазы и образцов с высоким содержанием вторичных метаболитов. Ядра изолировали в градиенте сахарозы из фиксированной в жидком азоте ткани растений. Ткань для выделения общей ДНК также фиксировали и растирали в жидком азоте, изолировали в СТАВ буфере, полученный экстракт НК инкубировали 30 мин. с РНКазой при 65°C и 1 час с протеиназой при 45°C. Образцы один раз экстрагировали смесью хлороформ/изоамиловый спирт(24/1) и осаждали изопропанолом. Количество хлоропластных и митохондриальных ДНК копий в полученных образцах оценивали, используя количественную ПЦР в реальном времени. По сравнению с методом выделения тотальной ДНК, образцы, изолированные из ядер, были существенно обогащены ядерной ДНК с незначительным присутствием копий хлоропластной (13 и 5%) и митохондриальной ДНК (17 и 6%, соответственно). Используя ткани различного типа или различного возраста, например, листьев, или изменяя условия роста растений, можно также снизить долю органелльных копий в геномной ДНК.

Был предложен протокол, позволяющий, по утверждению исследователей, выделять ДНК, пригодную для целей рестрикции и амплификации, из бактерий, грибов и растений без использования потенциально опасных растворителей фенола и хлороформа [18]. Для выделения ДНК использовали листья двухнедельных проростков сегрегирующей популяции trifoliolate bean.

Два листовых диска помещали в микроцентрифужные пробирки во льду, добавляли TES буфер экстракции (0,2 М Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8, 0,5 М NaCl, 1% SDS) и промытый кислотой морской песок или 0,5 мм стеклянные шарики и растирали ткань прямо в пробирках во льду и далее добавляли буфер с протеиназой К, инкубировали при 65°C, добавляли ацетат аммония, осаждали изопропанолом, отмывали 70% этанолом, подсушивали осадок и растворяли в ТЭ буфере. Показания 260/280 нм выделенных образцов ДНК были в пределах 1,63-1,99. ДНК была доступна для действия пяти рестриктаз: EcoR I, Rsa I, Taq I, EcoR V, Hind III. Преимуществами метода являются небольшое количество исходной ткани листьев, простота метода, минимизация загрязнений, неиспользование токсичных фенола и хлороформа, возможность обрабатывать до 100 образцов в день.

Для семи видов, представителей семейств Agavaceae, Curiacaceae, Cucurbitaceae, Graminaeae, Palmae, Rutaceae, Solanaceae был отработан простой протокол, позволяющий за короткое время выделить из множества образцов 1-2 мкг ДНК из 1 г ткани (260/280 нм от 1,6 до 2,0) [19]. Все листья растений хранили при -80°C, лиофилизировали, растирали и 30-40 мг ткани: а) помещали в 2 мл центрифужные пробирки, добавляли 1 мл буфера экстракции (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 700 mM NaCl, 50 mM EDTA (pH 8,0), 1% (СТАВ) (w/v), 140 mM β-меркаптоэтанол. Затем вносили 16 мкл РНКазы А и перемешивали; б) инкубировали при 65°C, охлаждали, инкубировали 10 мин., добавив 600 мкл хлороформа (осторожно перемешивая); в) центрифугировали 10 мин. при 15,682 g, верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли 700 мкл охлажденного изопропанола, осторожно перемешивали и инкубировали 10 мин. при -80°C; г) центрифугировали 5 мин. при 15,682 g, супернатант отбрасывали, осадок промывали 500 мкл 70% этанола, подсушивали при комнатной температуре, ресуспендировали в 50 мкл ТЭ буфере. Продукты амплификации полученной ДНК (два SSR праймера хлоропластов) были высоко воспроизводимы.

Модифицированный метод (СТАВ), предложенный ранее [20], был использован для выделения ДНК из растений томатов для идентификации локусов, ответственных за реализацию процесса регенерации *in vitro* [21]. Листья из культивируемых *in vitro* растений сразу после взятия проб замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Анализ на основе ДНК картирующих популяций томатов с высокой и низкой способностью к регенерации *in vitro* позволил локализовать новые локусы двух кандидатов-генов: аллель гена, способствующего высокой регенерации Rg-2 (вероятная аллель Rg-1 на хромосоме 3) и LESK1, кодирующего серин/треонинкиназу, предположительного маркера компетенции регенерации.

Для скрининга большого количества образцов на наличие трансгена лимитирующим фактором является время. Для скрининга 50 трансгенных растений рапса *Brassica napus* и табака *Nicotiana tobaccum* свежие листья помещали в стерильные пробирки типа Эппендорф, слегка размягчали стерильным наконечником дозатора и добавляли экстрагирующий буфер (200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS). Инкубировали при 60°C около 30 мин., добавляли смесь хлороформ:изоамиловый спирт (24:1), центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин. при 4°C . Водную фазу переносили в другую пробирку, добавляли равный объем изопропанола, инкубировали при -20°C 30 мин. Центрифугировали, осадок сушили, после чего растворяли в 100 мкл ТЭ буфера. Для избавления от полисахаридов центрифугировали при 15000 g 2 мин. Надосадочная жидкость содержала ДНК в концентрации 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ с показаниями отношения 260/280 нм $\sim 1,8$ [22].

Исследователи [23] разработали метод выделения ДНК без гомогенизации растительного материала и центрифугирования. Основным способом избавления от клеточной стенки являлась правильно подобранная энзиматическая смесь выделенных из *Trichoderma longibrachiatum* различных карбогидраз, гидролизующих клеточные стенки. Оптимизация времени инкубации для каждого из испытанных видов растений способствовала выходу ДНК без ее фрагментации. Для эксперимента были взяты 156 видов

растений и 126 из них дали положительный результат. Для мацерации тканей использовали 96-луночные микротитрационные планшеты фирмы Promega (Wizard® Magnetic 96 Plant System kit), для процедуры экстракции ДНК из жидкости, содержащей остатки клеточных стенок и другого «мусора», использовали магнитные частицы Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal kit (Dyna), Wizard® Magnetic 96 Plant System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device. Исследователи утверждают, что таким методом можно выделять ДНК не только из свежих, но и из высушенных листьев и размельченных семян.

3.4. Выделение ДНК из обезвоженных (дегидрированных тканей).

Использование свежего растительного материала в биогеографии, изучении биоразнообразия, в крупномасштабных исследованиях размера генома весьма ограничено. Дегидрированный растительный материал имеет определенное преимущество, поскольку нет необходимости хранить образцы в морозильнике. Такой материал может транспортироваться на далекие расстояния. Гербарные образцы, семена, образцы, лиофильно высушенные или фиксируемые в силикагеле, зачастую используются в целом ряде исследований для выделения из них ДНК..

В исследовании [24] высушенные с помощью силикагеля образцы были использованы для оценки размера генома, предполагая взятие образцов географически широко распространенных растений, когда сбор коллекций свежего материала неосуществим. Данный способ, по расчетам исследователей, имеет ошибку (<10%), сравнимую с таковой других используемых методологий, например, определением размера генома с помощью флоу-цитометрии (flow cytometry); в зависимости от стадии развития растений при взятии образцов; влиянии вторичных метаболитов и даже различий между индивидами отдельных видов, различными используемыми буферами. Очевидно при этом, что существуют лучшие и худшие комбинации упомянутых факторов для оптимального определения размера генома.

Высушивание с силикагелем имеет определенный недостаток, заключающийся в том, что количество выделяемой ДНК незначительно, а на качество влияют фенолы в образцах. Дело в том, что высушивание в силикагеле имеет сходство с процессами, происходящими в растениях при старении (senescence), обусловленном стрессовыми факторами и/или завершением вегетации, когда происходит накопление фенольных соединений и активация гидролитических ферментов (ДНКаз в том числе) и т.д. В работе [25] исследователи попытались улучшить показатели выделения ДНК, предварительно на 24, 36 или 48 часов замачивая свежие собранные листья в

спирте различных концентраций (70, 80, 90, 95, 100%). После чего их помещали на силикагель в целлофане на 8 суток. ДНК изолировали в СТАВ буфере. Идея была основана на том, что этанол нарушает целостность клеточных стенок, необратимо дезактивирует ДНКазы и гидролизует углеводы при комнатной температуре. В эксперименте сравнивались листья, предварительно замачиваемые в этаноле, сразу высушенные в силикагеле и свежие листья. Предобработка этанолом до помещения в силикагель достоверно увеличила количество выделенной ДНК по сравнению с образцами, сразу высушиваемыми в силикагеле.

Исследователи [26] предложили два протокола микроэкстракции, применимые для высушенных на силикагеле образцов эндемичного растения *Entelea arborescens* (Malvaceae). Принципиальная особенность метода заключалась в первой стадии двухкратного отмывания гомогенизированных в жидком азоте образцов в буферах (10-30 мг) в STE- (0,25 M sucrose, 0,03 M Tris, 0,05 M EDTA) или HEPES- (2% b-mercaptoethanol, 0,2% PVP, 0,1 M HEPES, pH 8,0). Осаждение ДНК изопропанолом проводилось при комнатной температуре, что снижало возможность соосаждения полисахаридов с ДНК. STE/СТАВ метод оказался гораздо более экономичным и без использования меркаптоэтанола.

Поскольку лиофилизаторы достаточно дороги и продолжительность процесса может достигать нескольких дней, обезвоживание растительных тканей возможно в потоке сухого теплого воздуха (food dehydrator) при 45-55°C от 12 до 24 часов с последующим измельчением, например, в центрифужных пробирках в миксере со стеклянными шариками [27]. Качество полученной ДНК соответствовало таковому при выделении из свежзамороженного растительного материала. Преимущество данного метода в простоте, низкой стоимости и эффективности выделения стабильной ДНК без использования фенола или хлороформа, а также возможности экстрагирования ДНК из множества растительных образцов.

3.5. Гербарный материал.

Подходы к изучению филогенетических взаимоотношений и уровню биоразнообразия предполагают использование быстрых, эффективных недорогих методов экстракции из множества гербарных образцов чистой ДНК, амплифицируемой в ПЦР и доступной для действия рестриктаз. При этом может иметь значение как способ подготовки гербарного материала, способ и время его хранения, так и вид и орган используемого растения для выделения ДНК, т.е. присутствия полисахаридов, фенолов и других органических соединений. Определенным требованием в данных исследованиях является возможность выделения ДНК из очень небольшого количества гербарного образца.

С целью филогенетических исследований было использовано 17 гербарных образцов от 2 до 151 года хранения [28]. Для избавления от контаминаций ДНК экстракцию и подготовку к ПЦР проводили в изолированном помещении. Выделение ДНК осуществляли с использованием 4 протоколов: два модифицированных (СТАВ) метода, модифицированный (DTAB) и метод с использованием гуанидинтиоционата и силика-частиц. Ингибирующие компоненты удаляли с помощью нерастворимого (PVP), а также в реакции ПЦР увеличением концентрации $MgCl_2$, добавлением бычьего сывороточного альбумина (BSA) или разбавлением экстракта (template) ДНК. Поскольку положительный эффект этих добавок был неравноценен в различных образцах, исследователи сделали предположение о наличии трех классов ингибирующих веществ. При низкой концентрации повторную амплификацию осуществляли с внутренними праймерами для увеличения количества ДНК для секвенирования. В результате этих модификаций в 8-ми образцах из 17-ти была осуществлена успешная амплификация.

Использование 5-ти протоколов для выделения ДНК [29] из свежих и гербарных листьев, содержащих большое количество фенолов, представителей пяти секций рода *Dalbergia* (73 образца 33 видов), показало, что наилучшие

результаты для большинства испытанных видов – это присутствие ПВП для связывания фенолов, высокая молярная концентрация NaCl, препятствующая соосаждению полисахаридов и ДНК и LiCl для удаления РНК селективным осаждением. Свежие листья были собраны в различных регионах Бразилии, заморожены при -20°C . Для экстракции использовали протокол А (СТАВ, Трис-HCl, NaCl, ПВП, ЭДТА, меркаптоэтанол); протокол В (ацетат натрия, ЭДТА, NaCl, ДТТ, ПВП и протеиназа К); протокол С (СДС, Трис-HCl, NaCl, ЭДТА, меркаптоэтанол и ПВП); протокол Д (Трис-HCl, EDTA, сорбит, бычий сывороточный альбумин и ПВП); протокол Е – (Qiagen DNeasy Plant Kit). Качество ДНК оценивали после электрофореза в агарозе, а также по отношению поглощения при 260/280 нм. ДНК гербарных образцов было удовлетворительным только для 8-ми из 54 образцов, из чего авторы заключили, что способы приготовления гербарных образцов имели критическое значение.

Вследствие нестабильности ДНК сухих гербарных образцов исследователи стараются минимизировать при выделении действие на опытные образцы химических реагентов. Так, [30] предлагают довольно простой метод экстракции ДНК из гербарных образцов различного возраста (от 7 до 118 лет). Перед использованием поверхность листьев с помощью абсорбирующей бумаги очищали от грибковых загрязнений. Семена и стебли промывали бидистиллятом, погружали в жидкий азот и растирали в СТАВ буфере с ЭДТА и меркаптоэтанолом. ДНК осаждали в смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24/1), после центрифугирования добавляли изопропанол и оставляли на час при -20°C , осадок отмывали 80% этанолом и оставляли на ночь при -20°C , после переосаждения осадок высушивали и хранили в ТЭ буфере. Растительный материал, хранившийся между листами бумаги, не подвергавшийся действию химических соединений, высоким температурам или микроволновому действию, с наибольшей вероятностью обеспечивал хороший результат. Деградация ДНК, по определению исследователей,

является скорее результатом неудовлетворительного хранения, а не его продолжительности.

Итак, способ хранения фиксированных первичных образцов, например, листьев, имеет существенное значение для эффективности выделения ДНК. В работе [31] использовали листья *Ocimum gratissimum*, представителя семейства *Lamiaceae* (Яснотковые), являющегося лекарственным растением и накапливающим эфирные масла. Половину образцов листьев промывали стерильной дистиллированной водой, другую нет. Из каждой половины листа: а) замораживали при -76°C ; б) 48 часов сушили при 50°C и затем хранили в темноте при комнатной температуре; в) сушили на воздухе и затем хранили в темноте при комнатной температуре; г) сушили в силикагеле и затем хранили в темноте при комнатной температуре. Все образцы хранились в течение месяца до выделения ДНК. Для изолирования ДНК использовали 4 протокола: модифицированный СТАВ с меркаптоэтанолом или ДТТ, модифицированный СДС с меркаптоэтанолом или ДТТ. Очищенная ДНК обрабатывалась ДНКаз-свободной РНКазой. Хорошего качества и в достаточных количествах ДНК выделялась при использовании СДС с ДТТ. Способ фиксации и хранения листьев оказал влияние на качество и количество выделяемой ДНК. В общем, образцы подвергались серьезному окислению, если пребывали во влажных условиях после сбора. Следовательно, требуется как можно более быстрое высушивание или замораживание образцов. Наибольший выход ДНК был из быстро высушенных, или из быстро замороженных образцов. Другим определяющим фактором явилось промывание образцов сразу после сбора дистиллированной водой. Большинство образцов начинали гнить в процессе хранения. Поэтому для предотвращения гниения и удаления загрязнений с поверхности листьев, просто протирание хлопковой тканью, смоченной спиртом, явилось лучшим вариантом.

Был предложен простой, недорогой протокол, который, по результатам амплификации и секвенирования, позволил выделить качественную ДНК, как

из свежих, гербарных, так и высушенных в силикагеле образцов; из листьев, стеблей, лепестков высших растений – представителей семейств Aizoaceae, Araceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Caryophyllaceae, Commelinaceae, Malvaceae, Nyctaginaceae, Poaceae, Portulacaceae, and Rubiaceae, в том числе из видов с высоким содержанием мукополисахаридов [32]. Согласно полученным результатам, амплификация областей хлоропластного генома была успешна во всех тестированных образцах, эффективность подтвердилась также амплификацией и секвенированием продуктов до 1 кб из ДНК, выделенной из 60-летнего гербарного образца. Концентрация ДНК из гербарных образцов была в пределах от 20 до >1050 нг/мкл, из свежих тканей – от 100 до 2500 нг/мкл.

Выделение ДНК из листьев *Vitis Vinifera* L.

Экстрагирование ДНК из листьев растений рода *Vitis* является сложной задачей, так как в винограде содержатся вещества, затрудняющие ее использование в молекулярно-генетических исследованиях. В работе были использованы усовершенствованные методы выделения ДНК с частицами силики (SiO₂) в качестве абсорбента, позволяющие улучшить качество и скорость работы. Общей проблемой высших растений при выделении ДНК являются загрязняющие вещества, у винограда - это присутствие повышенного содержания полисахаридов и полифенолов. В процессе экстрагирования ДНК образуется коллоидная гиалосома, которая практически не растворима в водной среде или ТЕ-буфере (10 mM Tris- HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). В дальнейшей работе это влияет на использование ДНК в исследованиях путем угнетения энзимной активности реакции. Также ДНК из выделенных образцов становится не стабильной для длительного хранения.

Усовершенствованные протоколы.

Модификации как правило имеют в себе комбинирование различных аспектов ранее приведенных, т.е. предыдущих методов экстракции, а именно методов с использованием раствора СТАБ (цетилтриметиламониум бромид) и с раствором сорбента оксида кремния. Извлечение ДНК не всегда является

простым и рутинным делом, и опубликованные протоколы не обязательно являются воспроизводимыми для всех видов растений

Задачами являлось определить, какой из трех общих Задачами являлось определить, какой из трех общих методов. Выделение ДНК (СИЛИКА-МЕТОД № 1 и SDS-МЕТОД № 2), позволяет выделять ДНК из виноградных листьев и какая стадия развития виноградного растения является наиболее пригодной для их сбора.

Материалы СИЛИКА-МЕТОД № 1 [33].

Растворы для выделения:

- Экстракционный буфер: 10 г СТАВ (цетилтриметиламониум бромид); 140 мл 5 М NaCl; 25 мл 2 М Tris-HCl (pH 8); 20 мл 0.5 М EDTA (pH 8). Доводим до объема в 500 мл чистой водой и проавтоклавировать.

- Раствор силики: смешать 1 часть частиц силики (Sigma S-5631) с 1 частью (к объему) стерилизованной воды (1 г–к–1 мл). Все приготовления проводить под вытяжкой. Тщательно перемешать и оставить на 12-24 ч. Затем вылить верхнюю жидкую фазу, нижний раствор с частицами оксида кремния «силики» повторно разбавить с аналогичным количеством воды, которая была добавлена в начале процесса приготовления. Перемещать на вортексе и дать отстояться в течение 5-10 ч, вылить верхнюю жидкую фазу и удалить остаток воды путем испарения. Повторить процедуру с добавлением воды и ее удаления из частиц;

- Промывочный буфер: 25% изопропанол; 25% этанол; 100 мМ NaCl; 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4); 2 мМ EDTA (pH 8); довести до 100% объема чистой водой и проавтоклавировать;

- 5 М NaCl;

- 70% выделения

- 1) Добавить 1200 мл экстракционного буфера (добавить 0,2% В-меркаптоэтанола только перед использованием) и 2 мкл рибонуклеазы А к растительному материалу и перемешать на вортексе.

- 2) Инкубировать при 37° С от 5 мин. до 10 часов.

- 3) Добавить 500 мл хлороформа: спирт и перемешать тщательно 20-25 мин.
- 4) Отцентрифугировать при 6000 оборотах 15 мин. При комнатной температуре.
- 5) Перенести верхнюю фазу в новую пробирку.
- 6) Добавить 200–800 мкл раствора с частицами оксида кремния и перемешивать в течение 5 мин. по часовой стрелке.
- 7) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин.
- 8) Удалить супернатант аккуратно.
- 9) Промыть промывочным буфером путем добавления добавления 1000 мл.
- 10) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин.
- 11) Удалить супернатант аккуратно.
- 12) Повторить шаги 9, 10 и 11.
- 13) Высушить в течение 37° С 3 мин. и перевернуть пробирки для легкого высушивания.
- 14) Растворить белый осадок в 400 мкл ТЕ.
- 15) Инкубировать 68° С в течение 15 мин.
- 16) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин. и перенести супернатант в новую пробирку.
- 17) Промыть ДНК путем добавления 0.1 объема 5 М NaCl; затем добавить к общему объему 60% изопропанола.
- 18) Перемешать 1 мин., отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин., удалить супернатант.
- 19) Промыть осадок 70% этанолом.
- 20) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин. и вылить супернатант.
- 21) Определить качество ДНК на спектрофотометре при длине волны A260.
- 22) Положить при -70° С на длительный период хранения и -20° С на короткий период хранения.

Качество ДНК было оценено спектрофотометром при длине волны 260\280 нм абсорбционным рангом (Nanodropе 2000). Для этого разбавляли раствор с ДНК в соотношении 1:50 (20 мкл стокового раствора ДНК + 980 мкл стерилизованной воды) при длине волны 260 нм (для ДНК) и длине волны 280 нм (абсорбционная длина поглощения света для белков) и затем рассчитывали концентрацию ДНК в стоковом растворе. Спектральный уровень продуктов ($A_{260/280}$ и, в некоторых случаях, $A_{260/230}$) коррелировал с качеством амплификации ДНК, давая оценку качества чистоты ДНК в образце. Однако, остаточное содержание солей и РНК, загрязняющие и вторичные растительные метаболиты, могут снизить количество ДНК и неправильно быть оценены с помощью данного метода. Это связано с тем, что данный метод является не совсем удачным для оценки маленького количества ДНК (<1 нг/мл), потому что считается, что денситометрические методы являются не способными определить маленькое содержание ДНК в пробе [34]. В ходе исследования методы позволили выделить ДНК из исследуемых образцов, при этом качество ДНК сильно варьировало. Она хорошо проявилась при визуализации на агарозном геле.

Рис. 1. Выделение ДНК методом № 1 с использованием раствора силики (СИЛИКА-МЕТОД № 1).

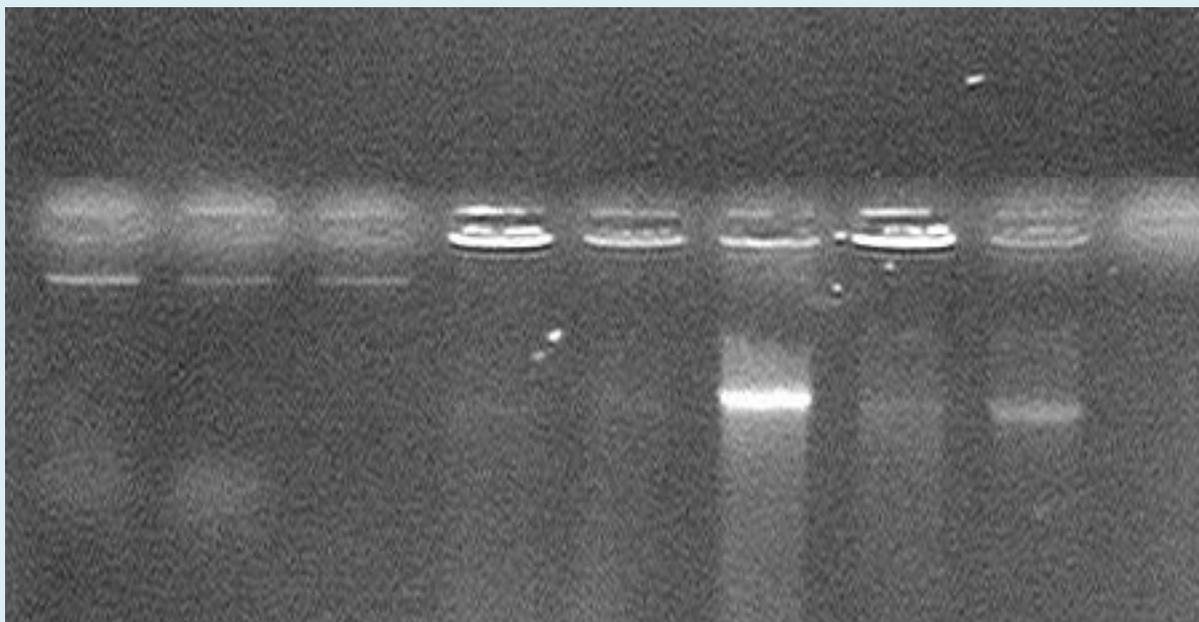
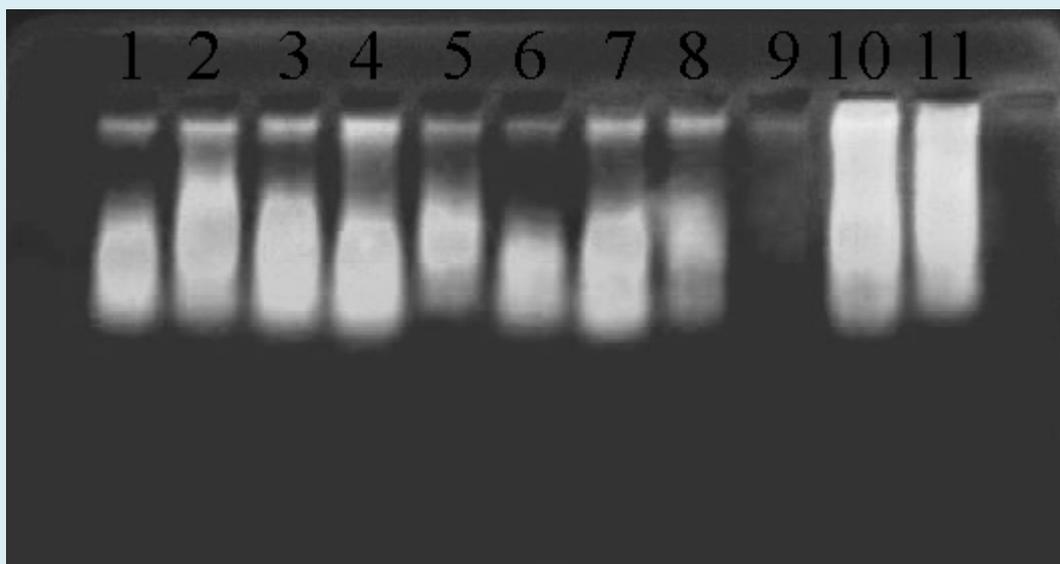


Рис. 2. Метод выделения ДНК с использованием додецилсульфата натрия (SDS-МЕТОД).



При экстракции методами № 1 ДНК выделилась из молодых листьев, при этом раствор не был вязкий, а также имел слегка белый и прозрачный цвета. При экстракции методом № 2 (SDS-МЕТОД) с использованием додецилсульфата натрия образовался верхний плотный и толстый слой белков и жиров сразу после добавления изопропанола к растительному материалу при инкубации ДНК с ацетатом калия при 4° С. Поэтому их видно на агарозном геле (рис. 2). Этот слой легко можно удалить путем аккуратного микропипетирования нижнего слоя, содержащего ДНК. В ходе выделения методом № 2 загрязняющие вещества также осаждаются с ДНК, поэтому раствор относительно вязкий. Это делает ее не пригодной для дальнейших биологических изысканий, так как влияет на ферментативную активность [35].

В дальнейшем была проведена амплификация ДНК для определения ее качества с использованием 6 нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров.

Молодые апикальные листочки силика-метод № 1 бело-прозрачный не вязкий, отлично виден sds-метод слегка коричневый вязкий слабо не виден;

Зрелые листья, собранные в середине вегетационного сезона силика-метод № 1 бело-прозрачный не вязкий слабо виден силика-метод № 2 прозрачный не вязкий слабо виден sds-метод коричневый вязкий не виден;

Зрелые листья, замороженные силика-метод № 1 белый не вязкий не виден, sds-метод № 2 коричневый вязкий не виден;

Зрелые листья, замороженные (5-летние) силика-метод № 1 коричневый не вязкий не виден, sds-метод № 2 коричневый вязкий не виден;

Гербарные листья силика-метод № 1 прозрачный не вязкий не виден и sds-методе № 2. Полностью не амплифицировалась ни одна ДНК, выделенная всеми двумя методами, из зрелых листьев, собранных 2 года назад и хранившихся в замороженном состоянии – дорожки 7, 8 и 9, также ДНК, выделенная из зрелых листьев, собранных 5 лет назад – дорожки 10, 11 и 12, и из гербарных листьев.

Выводы

Качество ДНК при спектрофотометрическом анализе из листьев, выделенных из 200 растений, показала следующие результаты:

- Количество ДНК варьировало в пределах 0,200-0,340 мг/г к свежему весу.
- Применение в качестве базового раствора SDS–буфера резко сокращает количество ДНК, которое может быть использовано для амплификации ДНК по сравнению с методами СТАБ и раствора оксида кремния.
- Также в работе была выявлена зависимость влияния времени инкубации на качество ДНК: инкубация при 37° С улучшает количество ДНК. Время инкубации является важным условием, которое снижает одновременно качество образца: оптимальным является от 20-30 мин.
- Важным условием при экстрагировании ДНК является использование дополнительной промывки со специальными буферными растворами и изопропанолом в обоих методах.

5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. «Молекулярное клонирование». М., Мир, 1984.
2. Патрушев Л.И. «Искусственные генетические системы». Т. 1. «Генная и белковая инженерия». М., Наука, 2004.
3. Патрушев Л.И. «Экспрессия генов». М., Наука, 2000.
4. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия». Изд-во Новосиб. ун-та, Т. 1, 1994; Т. 2, 1997.
5. Хеймс Б. и Хиггинс. М., «Транскрипция и трансляция». Методы. Мир, 1987.
6. Липкина В.М. М., «Проблема белка». Т.1. «Наука», 1995.
7. Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. «Специфика выделения ДНК из растительных объектов».
8. Остроумов Л.А., Просеков А.Ю., Архипов А.Н., Мудрикова О.В. «Метод выделения растительной днк из растений и продуктов питания на их основе». 2010.
9. McCouch S.R., McNally K.L., Wang W., Sackville Hamilton R. Genomics of gene banks: A case study in rice // Am J Bot. - 2012. - V.99. - P. 407-423.
10. Bhullar N.K., Zhang Z., Wicker T., Keller B. Wheat gene bank accessions as a source of new alleles of the powdery mildew resistance gene Pm3: a large scale allele mining project // BMC Plant Biol. - 2010. – V.10:88.
11. CBOL Plant Working Group. Collaborators (52) Hollingsworth P.M. Hollingsworth P.M., Forrest L.L., Spouge J.L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., van der Bank M., Chase M.W., Cowan R.S., et al.) A DNA barcode for land plants // Royal Botanic Garden Edinburgh, Edinburgh EH3 5LR, United Kingdom // Proc Natl Acad Sci USA. - 2009. -V.106. - P. 12794-12797.
12. Hodkinson T.R., Waldren S., Parnell J.A.N., Kelleher C.T., Salamin K., Salamin N. DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation // J Plant Res. - 2007. - V.120. - P. 17–29.

13. Gregory T.R., Nicol J.A., Tamm H., Kullman B., Kullman K., Leitch I.J., Murray B.G., Kapraun D.F., Greilhuber J., Bennett M.D. Eukaryotic genome size databases // *Nucleic Acids Research*. - 2007. - V. 35. - P. 332-338 Database issue.
14. Flavell R.B., Bennett M.D., Smith J.B., and Smith D.B. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants // *Biochemical Genetics*. - 1974. - V.12. - P. 257-269.
15. Arumuganathan K., Earle E.D. Nuclear DNA content of some important plant species // *Plant Molecular Biology Reporter*. - 1991. - V. 9. - P. 3208-3218.
16. Li J-F, Li L., Sheen J. Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology // *Plant Methods*. - 2010. - 6:1.
17. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Res*. - 1980. - V. 8. - P. 4321-5.
18. Li Q-B., Cai Q., Guy Ch.L. A DNA extraction method for RAPD analysis from plants rich in soluble polysaccharides // *Plant Molecular Biology Reporter*. - 1994. - V. 12. - P. 215- 220.
19. Barnwell P., Blanchard A.N., Bryant J.A., Smirnoff N., Fredweir A. Isolation of DNA From The Highly Mucilagenous Succulent Plant Sedum Telephium // *Plant Molecular Biology Reporter*. - 1998. - V. 16. - P. 133–138.
20. Kim C.S., Lee C.H., Shin J.S., Chung Y.S., Hyung N.I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP // *Nucleic Acids Research*. – 1997. - V. 25. - N5. - P. 1085–1086.
21. Borse T., Joshi P., Chaphalkar S.. Biochemical Role of Ascorbic acid during the Extraction of Nucleic Acids in Polyphenol Rich Medicinal Plant Tissues // *J Plant Mol Biol Biotechnol*. - 2011. - V. 2: (2). - P. 1-7.
22. Amani J., Kazemi R., Abbasi A.R., Salmanian A.H. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis // *Iranian journal of biotechnology*. - 2011. - V. 9. - P. 69-71.

23. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components // *Plant Molecular Biology Reporter*. - 1997. – V. 15. - P. 8-15.
24. Li J.T., Yang J., Chen D.C., Zhang X.L., Tang Z.S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower // *Genetics and Molecular Research*. - 2007. - V. 6. - P. 1064-1071.
25. Echevarría-Zomeño S., Abril N., Ruiz-Laguna J., Jorrín-Novo J., Maldonado-Alconada A.M. Simple, rapid and reliable methods to obtain high quality RNA and genomic DNA from *Quercus ilex* L. leaves suitable for molecular biology studies // *Acta Physiol Plant*. - 2011. - 13 p.
26. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. - 1990. - V. 12. - P.13-15.
27. Niu C., Kebede H., Auld D.L., Woodward J.E., Burow G., Wright R.J. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment // *African Journal of Biotechnology*. - 2008. - V. 7. - P. 2818-2822.
28. Hunt H.V., Campana M.G., Lawes M.C., Park Y.J., Bower M.A., Howe C.J., Jones M.K. Genetic diversity and phylogeography of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) across Eurasia // *Mol Ecol*. - 2011. - V. 20. - P. 4756-4771.
29. Brundu G., Lupi R., Zapelli I., Fossati T., Patrignani G., Camarda I., Sala F., Castiglione S. The origin of clonal diversity and structure of *Populus alba* in Sardinia: evidence from nuclear and plastid microsatellite markers // *Ann Bot*. - 2008. - V. 102. - P. 997-1006.
30. Bainard J.D., Husband B.C., Baldwin S.J., Fazekas A.J., Ryan G.T., Newmaster S.G., Kron P. The effects of rapid desiccation on estimates of plant genome size // *Chromosome Res*. - 2011. - V. 19. - P. 825–842.
31. Akinagbe A., Ji X.B., Yang M., Ewald D. Ethanol pretreatment increases DNA yields from dried tree foliage // *Conservation Genet Resour*. - 2011. - V. 3. - P.409–411.

32. Shepherd L.D., McLay T.G.B. Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue // *J Plant Res.* - 2011. - V. 124. - P. 311–314.
33. Tai Th.H., Tanksley S.D. A Rapid and Inexpensive Method for Isolation of Total DNA from Dehydrated Plant Tissue // *Plant Molecular Biology Reporter.* - 1990. - V. 8. - P. 297-303.
34. Savolainen V., Cuenoud Ph., Spichiger R., Martinez M.D.P., Crevecoeur M., Manen J-F. The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: evaluation and improvement // *Pl. Syst. Evol.* - 1995. – V. 197. - P. 87-98.
35. Ribeiro R.A., Lovato M.B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia* // *Genet. Mol. Res.* - 2007. - V. 6. - P.173-187.
36. Agostini G., Lu'dtke R., Echeverrigaray S., Teixeira de Souza-Chies T. Genomic DNA extraction from herbarium samples of *Cunila D. Royen ex L.* (Lamiaceae) and *Polygala L.* (Polygalaceae) // *Conservation Genet Resour.* - 2011. - V. 3. - P. 37–39.
37. Matasyoh L.G., Wachira F.N, Kinyua M.G., Muigai Th. A.W., Mukiama T.K. Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum L.* from Kenya // *African Journal of Biotechnology.* - 2008. - V. 7. - P. 557-564.