

УДК 633.854.78:577.2

DOI: 10.25230/2412–608X–2021–1–185–32–42

Исследование качества ДНК для полимеразной цепной реакции, экстрагированной разными способами из подсолнечника

С.З. Гучетль,¹

зав. лаб., вед. науч. сотр., канд. биол. наук

М.Л. Золотавина,²

канд. биол. наук

А.А. Григорьян,²

студент

А.В. Головатская,¹

млад. науч. сотрудник

¹ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

E-mail: saida.guchetl@mail.ru

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Россия, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149

Для цитирования: Гучетль С.З., Золотавина М.Л., Григорьян А.А., Головатская А.В. Исследование качества ДНК для полимеразной цепной реакции, экстрагированной разными способами из подсолнечника // Масличные культуры. – 2021. – Вып. 1 (185). – С. 32–42.

Ключевые слова: подсолнечник, ДНК, экстракция, способ, полимеразная цепная реакция, спектрофотометрия.

Изучение ДНК растений методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) занимает важное место в организации аграрной деятельности. Одним из этапов, предвещающим изучение ДНК, является его экстракция из растительного материала. В связи с этим целью данного изыскания было исследование качества ДНК, экстрагированной разными способами из семян, проростков и зеленых листьев подсолнечника. В качестве материала исследования выступала инбредная линия подсолнечника. Для анализа брали зародыши, сухие и замоченные на 24 ч семянки, корешки, 7-дневные проростки, зеленые листья. ДНК экстрагировали с использованием пяти способов: 1 – стандартный способ выделения (1%-ный СТАВ), 2 – модифицированный способ (2 %-ный СТАВ), 3–4 – выде-

ление наборами (Diamond DNA Plant Kit D, Россия; Lumiprobe, Германия), 5 – выделение из зеленых листьев (2%-ный СТАВ с добавлением активированного угля). Амплификацию выполняли в термоциклере S1000™ (BioRad, США). Спектрофотометрия проводилась на сканирующем спектрофотометре LEKI SS2110UV (Россия). После анализа всех предложенных способов был сделан вывод, что использованные способы позволяют экстрагировать ДНК из сухих семян, проростков и зеленых листьев подсолнечника с достаточной надежностью и воспроизводимостью, что подтверждается и результатами ПЦР. Не удалось выделить ДНК из корешков и семянок, замоченных на 24 часа, модифицированным способом (2%-ный СТАВ). Наиболее экономически выгодным является способ 1 (1%-ный СТАВ). По результатам спектрофотометрии показано, что наибольшую степень очистки ДНК позволяют получить способ 3 – выделение набором Diamond DNA Plant Kit D из проростков и способ 5 – выделение с применением 2%-го СТАВ с активированным углем из зеленых листьев. Способ 3 является еще и более предпочтительным по затрачиваемому на экстракцию ДНК времени.

UDC 633.854.78:577.2

Quality of DNA for PCR extracted from sunflower with different methods.

S.Z. Guchetl,¹ head of the lab., leading researcher, PhD in biology

M.L. Zolotavina,² PhD in biology

A.A. Grigoryan,² student

A.V. Golovatskaya,¹ junior researcher

¹V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

17 Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

E-mail: saida.guchetl@mail.ru

²Kuban State University

149 Stavropolskaya str., Krasnodar, 350040, Russia

Key words: sunflower, DNA, extraction, method, polymerase chain reaction, spectrophotometry.

Studying of plants DNA with PCR method plays an important role in the agrarian activity. Preceding stage of DNA studying is its extraction from plant material. We studied quality of DNA extracted by the different methods from seeds, seedlings, and green leaves of sunflower. We used an inbred sunflower line as a research object. For analysis we used embry-

os, dry and presoaked during 24 h seeds, roots, 7-day seedlings, green leaves. DNA was extracted using five methods: 1 – a standard method of extraction (1% CTAB), 2 – a modified method (2% CTAB), 3–4 – extraction with sets (Diamond DNA Plant Kit D, Russia; Lumiprobe, Germany), 5 – extraction from green leaves (2% CTAB with absorbent carbon). Amplification was conducted in thermocycler S1000™ (BioRad, USA). Spectrophotometry was done at scanning spectrophotometer LEKI SS2110UV (Russia). Analyzing all used methods we concluded they allow extracting of DNA from dry seeds, seedlings and green leaves of sunflower with sufficient reliability and repeatability, it is proved by PCR results. We couldn't extract DNA from roots and presoaked seeds with the modified method (2% CTAB). The most economically profitable is first method (1% CTAB). Due to the results of spectrophotometry, the highest level of DNA clearance can be reached with method 3 – extraction by a set Diamond DNA Plant Kit D from seedlings and method 5 – extraction by 2% CTAB with absorbent carbon from green leaves. The method 3 is more preferable by time necessary for DNA extraction.

Введение. Эффективное возделывание растительных ресурсов в современном мире во многом зависит от применения молекулярно-генетических исследований. Изучение ДНК растений методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) занимает важное место в организации аграрной деятельности: позволяет проводить научно-исследовательскую работу в сфере молекулярно-генетического маркирования, изучения геномов для их идентификации, в филогенетических исследованиях. Одним из этапов, предваряющим изучение ДНК, является его экстракция из растительного материала. Выделение ДНК из растительных клеток сопряжено с определенными трудностями. Получению высококачественной ДНК препятствует наличие клеточных стенок, вторичных метаболитов, таких как фенольные соединения, терпены, танины, алкалоиды и флавоноиды. Данные соединения обладают способностью связываться с ДНК и загрязнять препараты экстрагированной ДНК. Выделять ДНК хорошего качества необходимо на всех этапах развития рас-

тительного организма: от семянки до гербарного растения. Описано достаточно много способов экстракции ДНК из растительной ткани [1; 2; 3]. Каждый имеет индивидуальные особенности. Методика выделения ДНК включает в себя:

- лизис клеточной стенки;
- удаление ферментативных комплексов и вторичных метаболитов;
- осаждение и растворение ДНК.

Для получения более полной и достоверной информации о степени чистоты экстрагированной ДНК применяется метод спектрофотометрии – физико-химический, активно используемый в науке и практике. Метод основан на изучении изменения показателей в УФ областях спектра (200–400 нм) [4]. Позволяет на основе принципа пропускания пучка света через раствор и определения в условных единицах оптической плотности провести оценку чистоты препарата ДНК, измеряя оптическую плотность раствора при длинах волн 230 нм (для полисахаридов), 260 нм (для ДНК), 280 нм (для белков). Спектрофотометрия проводится в диапазонах длин волн (λ далее) A230/260 и A260/280 [5]. Нуклеиновые кислоты поглощают УФ излучение в областях от 240–290 нм с максимумом при 260 нм, хромофорами служат азотистые основания нуклеиновых кислот, особенно пиримидиновые, так как они поглощают УФ свет в 10–20 раз интенсивнее, нежели хромофоры белковых молекул, такие как фенилаланин, триптофан или тирозин [6].

Традиционно работа с объектом исследований начинается с подбора оптимального способа выделения ДНК [7; 8; 9]. Молекулярно-генетические исследования подсолнечника проводятся нами уже в течение нескольких десятилетий, но выделение ДНК в основном выполняли из проростков [10]. Однако получение такого рода растительного материала не всегда представляется возможным. В связи с этим целью данного изыскания было исследование качества ДНК, экстрагированной разными способами из растений

подсолнечника, находящихся на разных стадиях развития. Задачами исследования были:

- экстракция ДНК разными способами и определение его количества методом электрофореза в агарозном геле;
- определение качества ДНК после проведения ПЦР;
- определение качества ДНК методом спектрофотометрии.

Материалы и методы. В качестве материала исследования для всех способов экстракции выступала инбредная линия подсолнечника ВК 304. ДНК экстрагировали из навесок ткани от 50 до 200 мг растительного материала с применением пяти способов: 1 – стандартный способ выделения (1%-ный СТАВ, cetyltrimethylammonium bromide) [2], 2 – модифицированный способ (2%-ный СТАВ) [11], 3–4 – выделение наборами Diamond DNA Plant Kit D, Россия и Lumiprobe, Германия, 5 – выделение из зеленых листьев (2%-ный СТАВ с добавлением активированного угля) [12].

В качестве исследуемого материала использовали сухие зародыши, сухие и замоченные на 24 часа семянки, корешки, 7-дневные проростки, выращенные в темноте, зеленые листья.

Распределение видов растительного материала по способам экстрагирования представлено в таблице 1.

Таблица 1

Способы выделения ДНК и вид растительного материала

Способ выделения	Используемый материал
Способ 1	Семядольные листья 7-дневных проростков
Способ 2	1–3 – зародыши сухих семян
	4–6 – семянка, замоченная на 24 часа
	7–9 – корешки
Способ 3	10–12 – целые сухие семянки
	Семядольные листья 7-дневных проростков
Способ 4	1, 2 – зародыши
	3 – обезжиренная семянка
	4 – необезжиренная семянка
Способ 5	Зеленые листья

Растительную ткань измельчали с использованием гомогенизатора Speed Mill

plus (Analytic Jena, Германия). Гомогенизация выполнялась в течение 2–4 минут с металлическими шариками.

Для проведения ПЦР были использованы две пары SSR-праймеров (simple sequence repeat) (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика праймеров, использованных в работе

Праймер	Последовательности праймеров	Количество нуклеотидов
ORS 1209	F: CTA TGG GCC TCA CAA ACA CTT G	22
	R: GAT GTG AAA CAG CTC CAT ACT C	22
ORS 5	F: ATG TGG AGC AGC AAA TTC AG	20
	R: CTG CTG CCC ACC ATA CTG	18

Аmplификацию выполняли в термоциклере S1000™ (BioRad, США). ПЦР проводилась при следующих условиях амплификации: начальная денатурация – 2 мин 96 °С, затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг при 60 °С в течение 40 сек, элонгация – 1 мин при 70 °С, финальная элонгация – 2 мин. Все эксперименты проводили в нескольких повторностях.

Для определения количества выделенной ДНК использовали электрофорез ДНК в 1%-ном агарозном геле. Наиболее интенсивно флуоресцирующую фракцию ДНК принимали за 1 γ. Такие образцы для анализа ПЦР разбавляли в 10 раз. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2%-ном агарозном геле (1xTAE-буфер) с использованием камеры SE-2 для горизонтального электрофореза (Хеликон, Россия). Окрашивание осуществляли бромистым этидием. Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Спектрофотометрическое определение чистоты образцов ДНК, выделенной раз-

ными способами, позволило получить данные об оптической плотности образцов [5]. Спектрофотометрия проводилась на сканирующем спектрофотометре LEKI SS2110UV (Россия). Оптическая плотность (D) представляет собой отношение количества взвешенных частиц в растворе к контрольной пробе (ею выступала вода). Измерение D проводилась в двух диапазонах длин волн: $\lambda_{230/260}$ и $\lambda_{260/280}$. При длине волны 230 нм было определено содержание остаточных реагентов после выделения. При длине 280 нм – вторичных метаболитов и собственных веществ растения, помимо ДНК.

Математическая обработка полученных данных проводилась с применением критерия Манна-Уитни – статистического критерия для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака. Позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. [13].

Результаты и обсуждение. Экстракция ДНК из растений подсолнечника проводилась разными способами согласно рекомендаций авторов или производителей наборов для выделения.

Способ 1. Настоящий способ принято считать стандартным ввиду его широкого использования для многих культур [2; 10; 14; 15]. Для этого способа использовали семядольные листья 7-дневных проростков подсолнечника. Согласно данным гель-электрофореза, в 100 % случаев выделение было успешным, однако количество ДНК в полученных образцах различно (рис. 1). ДНК образцов 2–4, 7–9 имеет максимальную интенсивность, $\gamma = 1$. Относительно них можно сделать вывод о содержании ДНК в других образцах; соответственно, ДНК образцов под номерами 1, 5, 6, 10 имеет интенсивность 0,5 γ .

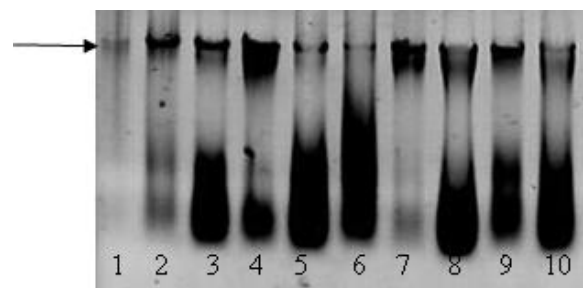


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры ДНК, выделенной с помощью 1%-го СТАВ [2].

Дорожки 1–10 – ДНК из семядольных листьев 7-дневных проростков подсолнечника. Стрелкой показаны фракции ДНК

Данный способ является еще и наиболее экономически выгодным, вследствие дешевизны и доступности реагентов для анализа по сравнению с другими, описываемыми в данной работе способами.

Способ 2. В основе способа лежит выделение ДНК подсолнечника с использованием экстракционного СТАВ-буфера в большей концентрации, чем в предыдущем. Помимо этого, к особенностям способа относится и увеличение объема органического растворителя хлороформ/изоамиловый спирт (700 мкл против 450 мкл у предыдущего способа). Это позволяет проводить дополнительную очистку и снижать количество метаболитов в выделенном материале.

Выделение ДНК проводилось из зародышей, извлеченных из сухих семян (образцы 1–3), семян, замоченных на 24 часа (4–6), корешков проростков (7–9), целых сухих семян (10–12) (табл. 1). Гомогенизация образцов в течение двух минут была приемлема для большинства образцов. Для целых сухих семян потребовалась дополнительная гомогенизация (4 минуты). Оценка количества выделенной ДНК после выделения проводилась в условиях горизонтального электрофореза (рис. 2).

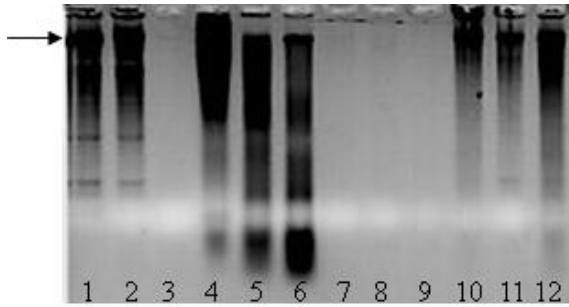


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры ДНК, выделенной с помощью 2%-го СТАВ [11].

Дорожки: 1–3 – зародыши;
4–6 – семечки, замоченные на 24 часа;
7–9 – корешки проростков;
10–12 – целые сухие семечки.
Стрелкой показаны фракции ДНК

Образцы ДНК на дорожках 1 и 2 демонстрируют достаточно большое количество ДНК. У ДНК из семечек, замоченных на 24 часа и сухих семечек также отмечается её высокая концентрация. Интенсивность флуоресценции образцов ДНК 1, 2, 4–6, 10–12 была принята как $\gamma = 1$. У образца 3 ДНК не выделилась. Экстрагировать ДНК из корешков данным способом не удалось (дорожки 7–9) (рис. 2).

Способ 3. Выделение ДНК подсолнечника с помощью набора Diamond DNA Plant Kit D. проводилось из 10 семядольных листьев 7-дневных проростков. Наборы для выделения ДНК характеризуются двумя важнейшими характеристиками: высокая скорость выделения и большой практический выход ДНК. Скорость выделения связана с простотой и оптимизацией процесса: производитель предлагает наличие всех компонентов для выделения, исключая этиловый спирт и протеазу. Эффективность высокая, ввиду полного ингибирования полифенолов и полисахаридов, которые могут блокировать ПЦР. После экстракции полученные образцы ДНК подвергали горизонтальному электрофорезу в агарозном геле (рис. 3).

36

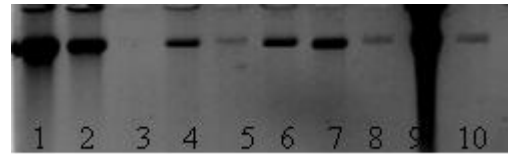


Рисунок 3 – Электрофоретические спектры ДНК, выделенной набором Diamond DNA Plant Kit D.

Дорожки: 1–10 – семядольные листья 7-дневных проростков подсолнечника

На рисунке 3 продемонстрированы четкие и интенсивные фракции ДНК образцов 1, 2, 4–8, 10. Это свидетельствует о достаточно большом количестве выделенного материала ($\gamma = 1$) и высокой степени его очистки. Образец 9 демонстрирует повышенную интенсивность, возможно, связанную с содержанием в образце примесей. Образец 3 активности ДНК не показал.

Способ 4. Экстракция набором Lumiprobe проводилась из зародышей (образцы 1, 2), обезжиренных (3) и необезжиренных (4) семечек подсолнечника. Технология выделения содержит все основные этапы (лизис клеточной стенки, промывка и очистка, осаждение). На рисунке 4 предоставлена геле-электрофореграмма результатов эксперимента.

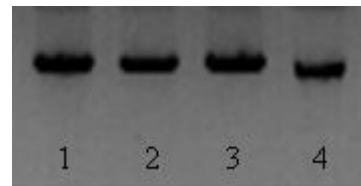


Рисунок 4 – Электрофоретические спектры ДНК, выделенной набором Lumiprobe. Дорожки:

1, 2 – зародыши; 3 – обезжиренная семечка;
4 – необезжиренная семечка

Согласно полученным результатам, выделение ДНК было успешным во всех случаях ($\gamma = 1$).

Способ 5. Для анализа данного способа был использован материал зеленых листьев подсолнечника. В основе способа –

стандартная методика выделения с увеличенным содержанием СТАВ (2 %), однако она проводилась с использованием активированного угля (как и в наборе Diamond DNA Plant Kit D) для увеличения степени очистки материала от примесей (в частности метаболитов, накопленных зелеными листьями подсолнечника). По количеству выделенной ДНК образцы были разделены на две группы. Количество ДНК из образцов 6, 7, 8, 10, 11, 12 (группа 1) было оценено как $\gamma = 1$, из образцов 2–5 (группа 2) – $\gamma = 0,8$. ДНК из образцов 1 и 9 либо не была выделена, либо ее точное значение не определялось (рис. 5).

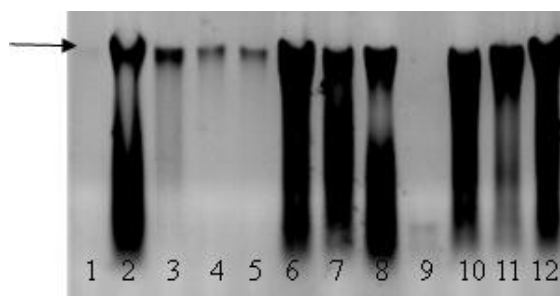


Рисунок 5 – Электрофоретические спектры ДНК, выделенной с помощью 2%-го СТАВ с активированным углем [12]. Дорожки: 1–10 – зеленые листья подсолнечника. Стрелкой показаны фракции ДНК

Таким образом, во всех изученных способах выделения ДНК прослеживается общая тактика – последовательные стадии, подразумевающие основные процессы для получения генетического материала (лизис, растворение, осаждение). Специфичность используемых реагентов и растительный материал, из которого экстрагируется ДНК, отражается на количестве выделенного продукта.

ПЦР ДНК

Для проверки качества ДНК, полученной разными способами, были выполнены реакции амплификации с несколькими

праймерами.

Способ 1. ДНК, выделенную из семядольных листьев проростков, амплифицировали с праймером ORS 1209 (рис. 6). Отжиг праймера осуществлен у всех образцов, фракции четкие, хорошего качества.

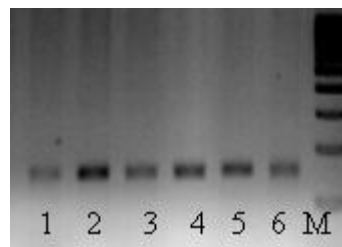


Рисунок 6 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК подсолнечника с праймером ORS 1209. Дорожки: 1–5 – пророски линии ВК 304, М – маркер молекулярной массы 100 бр

Таким образом, данный способ выделения приемлем для 7-дневных проростков.

Способ 2. При проведении ПЦР с праймером ORS 1209 с образцами, выделенными 2%-ным СТАВ, наблюдается отжиг у образцов 1, 2, 10–12 (рис. 7).

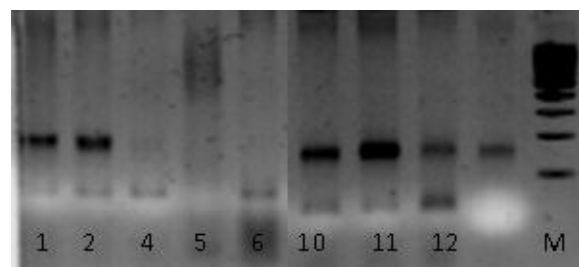


Рисунок 7 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК подсолнечника с праймером ORS 1209. Дорожки: 1–2 – зародыши; 4–6 семянки, замоченные на 24 часа; 10–12 – целые сухие семянки. М – маркер молекулярной массы 100 бр

Для образцов 1, 2, 10, 11, 12 получены четкие, хорошего качества фракции

амплифицированной ДНК. Несмотря на то, что выделение показало наличие фракции ДНК из семян, замоченных на 24 часа (дорожки 4–6), после проведения ПЦР отжига праймеров не наблюдалось. Следовательно, способ 2 для экстракции ДНК из этого типа растительного материала не подходит. Таким образом, данный способ выделения приемлем для целых сухих семян, а также для зародышей, извлеченных из сухих семян.

Способ 3. При проведении ПЦР с ДНК праймером ORS 5 отжиг был у большинства образцов (рис. 8).

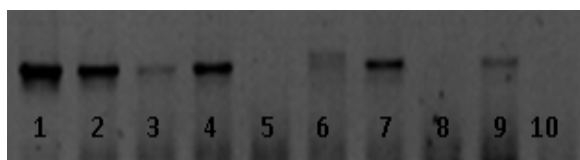


Рисунок 8 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК подсолнечника с праймером ORS 5. Дорожки: 1–10 – проростки линии ВК 304

Стоит отметить, что образец 3 не имел активности, однако отжиг наблюдается. Противоположная ситуация с образцами 5 и 10, имевшими интенсивность $\gamma = 1$, но не показавшими отжига. Отсутствие отжига может быть связано либо с малым количеством ДНК в реакционной смеси, либо с ингибированием ДНК в виду его недостаточной очистки. В целом, данный способ выделения приемлем для 7-дневных проростков.

Способ 4. Для проведения ПЦР-анализа образцы ДНК, полученные выделением с помощью набора Limiprobe, были разбавлены в 10 раз. Также была использована неразбавленная проба ДНК. При проведении ПЦР с ДНК с праймером ORS 5 отжиг был у большинства образцов (рис. 9).

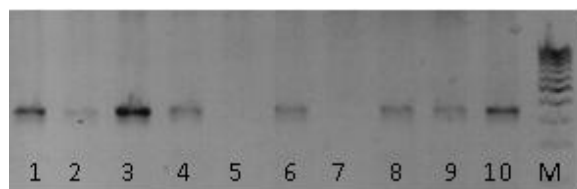


Рисунок 9 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК подсолнечника с праймером ORS 5. Дорожки: 1, 3, 5, 7 – не разбавленные образцы 1, 2, 3, 4 соответственно; 2, 4, 5, 6 – разбавленные образцы 1, 2, 3, 4 соответственно. М – маркер молекулярной массы 100 бр

Образцы 1 и 2 демонстрируют отжиг независимо от разбавления, однако разбавленные образцы показывают менее активную фракцию. Отжиг у номеров 3 и 4 отмечается только у разбавленных образцов, что свидетельствует о высоком содержании ДНК. Обезжиривание семянки не привело к улучшению качества амплификации и, следовательно, к дополнительной очистке выделенной ДНК.

Способ 5. Выделенные образцы подвергли ПЦР по паре праймеров ORS 1209. Образцы в группе 1 (дорожки 6, 7, 8, 10, 11) продемонстрировали отжиг в большинстве случаев (исключая 10). Образцы в группе 2 (дорожки 2–5) были амплифицированы не во всех случаях (рис. 10).

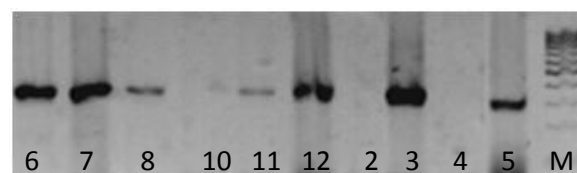


Рисунок 10 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК подсолнечника с праймером ORS 1209. Дорожки: 6, 7, 8, 10, 11, 2, 3, 4, 5 – зеленые листья линии ВК 304 М – маркер молекулярной массы 100 бр

Таким образом, данный способ экстракции достаточно эффективен для зеленых листьев, но процент удачных выделений составил около восьмидесяти.

Спектрофотометрия

Для получения более полной и достоверной информации о способах выделения ДНК нами был применен метод спектрофотометрии. В нашем исследовании спектрофотометрия проводилась в диапазонах длин волн (λ далее) $A_{230/260}$ и $A_{260/280}$ на основании стандартной методики определения оптической плотности Е [5]. За референтные значения были приняты показатели: для чистого образца полисахаридов/ДНК соотношение Е как $A_{230/260} = 1,8-2,2$; для ДНК – соотношение Е как $A_{260/280} = 1,8-1,9$.

При оценке чистоты образцов на наличие в них реагентов были получены следующие результаты (табл. 3).

Таблица 3

Результаты определения оптической плотности в образцах, выделенных различными способами

Способ выделения ДНК	D - оптическая плотность ($\lambda =$ длина волны)	
	$A_{230/260}$ ($X \pm m$)	$A_{260/280}$ ($X \pm m$)
Способ 1	$1,692 \pm 0,012^{\infty}$	$1,666 \pm 0,029^{\circ}$
Способ 2	$1,658 \pm 0,039$	$1,680 \pm 0,039^{\circ}$
Способ 3	$1,764 \pm 0,021^{**+}$	$1,870 \pm 0,020^{+ \circ}$
Способ 4	-	$1,800 \pm 0,029^{++}$
Способ 5	группа 1	$1,708 \pm 0,013^*$
	группа 2	$1,646 \pm 0,026$

Примечание: X – среднее значение, m – стандартное отклонение.
 $*$ – $p \leq 0,01$ – значимость различий между оптической плотностью при одном способе выделения с разными λ ;
 $**$ – $p \leq 0,05$ – значимость различий между оптической плотностью при одном способе выделения с разными λ ;
 $+$ – $p \leq 0,01$ – значимость различий между оптической плотностью при разных способах выделения (последовательно), но с идентичными λ ; $++$ – $p \leq 0,05$ – значимость различий между оптической плотностью при разных способах выделения (последовательно), но с идентичными λ ;
 $^{\circ}$ – $p \leq 0,01$ – значимость различий между оптической плотностью при разных способах выделения, но с идентичными λ ; $^{\infty}$ – $p \leq 0,05$ – значимость различий между оптической плотностью при разных способах выделения, но с идентичными λ .

Определение оптической плотности $A_{230/260}$ образцов при длине волны 230/260 нм, выделенных стандартным способом (способ 1), позволило получить значение $1,692 \pm 0,012$. В данных пробах отмечена значимость различий в сравнении со способом 3 и способом 4 ($p \leq 0,05$). Определение оптической плотности в образцах, выделенных модифицированным способом (способ 2), показывает, что отличий в

очищении от полисахаридов и ДНК от других способов нет. Такая же тенденция отмечена при оценке степени очистки образцов, выделенных набором Diamond DNA Plant Kit D (способ 3), оптическая плотность составила $1,764 \pm 0,021$. По техническим причинам измерение D образцов, выделенных набором Lumiprobe, при $A_{230/260}$ не было выполнено ввиду невозможности определения при длине волны 230 нм. Способ 5 (группа 1 и группа 2) позволил сравнить результаты выделения ДНК из зеленых листьев. При выделении способом 5 (группа 1) – 2%-ный СТАВ с активированным углем, соотношение $A_{230/260}$ составило $1,708 \pm 0,013$. Возможно, что в данных образцах остались следы используемых при экстракции реагентов. Нами были отмечены достоверные различия показателей способа 5 (группа 1) по сравнению с другими показателями, полученными как с идентичной длиной волны, так и при сравнении идентичной группы с разными длинами волн ($p \leq 0,01$). Во втором случае (способ 5, группа 2) соотношение оптической плотности достигло значения $1,646 \pm 0,026$: в таких образцах содержание реагентов несколько выше, однако остается низким по сравнению с другими способами. Значимые различия наблюдались в сравнении показателей оптической плотности и данных с измерениями последующих способов с идентичными длинами волн ($p \leq 0,01$). В своем исследовании Н.В. Водчиц, И.О. Зайцева и др. [4] отмечали, что пик поглощения серий полученных экстрактов зеленых листьев приходился на область $\lambda = 225-230$ нм. При сравнении двух диапазонов $A_{230/260}$ были также определены пики на участках около 260 нм.

Сравнение соотношения оптической плотности при $A_{260/280}$ показало другие тенденции: по результатам оценки оптической плотности все способы выделения и очистки значимо отличны друг от друга. Невысокое значение соотношения оптической плотности при $A_{260/280}$ ($1,666 \pm 0,029$) отмечалось у образцов, выделен-

ных стандартным способом (способ 1). Образцы имели повышенное количество метаболитов и тем не менее были обнаружены значимые различия между показателями группы и других групп при идентичной длине волны ($p \leq 0,01$). Выделение модифицированным способом (способ 2) показало результат несколько выше: $1,680 \pm 0,039$, однако его следует оценить как «низкий» по сравнению с очисткой другими способами. При этом наблюдались значимые различия в показателях с другими группами ($p \leq 0,01$). Высокие показатели оптической плотности $A_{260/280}$ были характерны при выделении ДНК с помощью наборов Diamond DNA Plant Kit D (способ 3) и Lumiprobe (способ 4), при сравнении которых с другими группами с идентичными длинами волн были обнаружены значимые различия: $p \leq 0,01$ (способ 3) и $p \leq 0,05$ (способ 4). Оценка степени чистоты выделения ДНК набором Diamond DNA Plant Kit D составила $1,870 \pm 0,020$, а выделение способом с применением набора Lumiprobe – $1,800 \pm 0,029$. Образцы, выделенные этими наборами, по-видимому, лучше очищены от метаболитов и от собственных белков, следовательно, имеют наибольшую степень очистки. Применение способа 5 (2%-ный СТАВ с добавлением активированного угля) (группа 1 и группа 2) при выделении ДНК из зеленых листьев в оценке оптической плотности показало следующие результаты в обеих группах: оптическая плотность $1,794 \pm 0,011$ и $1,738 \pm 0,033$ соответственно. Следовательно, в обеих группах образцы имеют приблизительно одинаковое содержание метаболитов. При этом значимость различий в первой группе составила $p \leq 0,01$, а во второй группе – $p \leq 0,05$. Согласно данным исследования оптической плотности ДНК, выделенной из *Vitis vinifera* L. [16], выделение из зеленых листьев подсолнечника при оптической плотности $A_{260/280}$ значительно ниже показателей, полученных в данном исследовании, – 0,98–1,56. В тоже время по результатам

исследования Н.В. Водчиц и др. [4] было выявлено, что их препараты ДНК при выполнении выделения протоколом А имели среднее значения соотношения поглощения 1,85, что схоже с полученными нами данными. Однако при использовании протокола Б соотношение было значительно снижено и составляло 1,45.

Использование набора Diamond DNA Plant Kit D (способ 3) при выделении ДНК в оценке оптической плотности при длине волны 230/260 и 260/280 в единственном случае показал значимость различий в $p \leq 0,01$, использование 2%-го СТАВ с добавлением активированного угля (способ 5, группа 1) показывает такую степень очищения компонентов смеси в оценке оптической плотности при длине волны 230/260 и 260/280 ($p \leq 0,01$) во всех случаях.

По результатам спектрофотометрии можно сделать следующие выводы:

- образцы ДНК, выделенные набором Diamond DNA Plant Kit D (способ 3), имеют наибольшую степень очистки и от реагентов, использованных для выделения, и от метаболитов растения ($p \leq 0,01$);
- образцы ДНК, выделенные модифицированным способом (способ 2), демонстрируют низкие показатели очистки;
- выделение ДНК стандартным способом (способ 1) позволяет получить среднюю степень очистки от метаболитов и реагентов;
- выделение ДНК с использованием 2%-го СТАВ с добавлением активированного угля (способ 5) позволяет очистить образцы от метаболитов.

Выводы. Таким образом, использованные способы позволяют экстрагировать ДНК из сухих семян, проростков и зеленых листьев подсолнечника с достаточной надежностью и воспроизводимостью, что подтверждается и результатами ПЦР. Не удалось выделить ДНК из корешков и семян, замоченных на 24 часа, модифицированным способом (2%-ный СТАВ). Наиболее экономически выгодным является способ 1 (1%-ный

СТАВ), который показывает среднюю степень очистки. Наибольшую степень очистки ДНК позволяют получить способ 3 – выделение набором Diamond DNA Plant Kit D из проростков, и способ 5 – выделение с применением 2%-го СТАВ с активированным углем из зеленых листьев. Способ 3 является еще и более предпочтительным по затрачиваемому на экстракцию ДНК времени.

Список литературы

1. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – V. 5. – P. 69–76.
2. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – 1987. – V. 19. – P. 11–15.
3. Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // *PNAS.* – 1984. – 81. – P. 8014–8018.
4. Водич Н.В., Зайцева И.О., Курикович И.Г. [и др.]. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой // *Вестник Полесского государственного университета. Серия природо-ведческих наук.* – 2014. – № 2. – С. 25–30.
5. Балановский О.П., Кагазежева Ж.А., Олькова М.В. Методы измерения концентрации ДНК: совпадение относительных величин и различия абсолютных // *Вестник РГМУ.* – 2019. – № 3. – С. 27–33. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.043.
6. Аукенов Н.Е., Масабеева М.Р., Хасаснова У.У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе // *Наука и здравоохранение.* – 2014. – № 1. – С. 51–53.
7. Dimitrijević A., Pejović I., Imerovski I., Dedić B., Pajević S., Miladinović D. DNA isolation from dry samples of broomrape – the effect of isolation method and sample storage on DNA yield and quality // *Romanian agricultural research.* – 2013. – No. 30. – P. 349–357.
8. Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Гермаш Н.Н., Антифеев И.Е. Методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток (обзор) // На-

учное приборостроение. – 2019. – Т. 29. – № 4. – С. 28–50.

9. Bulavin I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., Mitrofanova I.V., Zhdanova I.V., Khokhlov Yu.S. The quality of the DNA isolated from *Lavandula angustifolia* leaves // *Acta Horticulturae.* – 2020. – Vol. 1298. – P. 563–568. DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1298.77.

10. Antonova T.S., Guchetl S.Z., Tchelustnikova T.A., Ramasanova S.A. Development of marker system for identification and certification of sunflower lines and hybrids on the basis of SSR-analysis // *Helia.* – 2006. – Vol. 29. – No 45. – P. 63–72.

11. Определение сортовой принадлежности семян сои на основе микросателлитного анализа: методические рекомендации / Волков В.А., Вайман А.В., Потокина Е.К. Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова. – СПб, 2017. – 19 с.

12. Vroh Bi I., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai P. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction // *Plant breeding.* – 1996. – V. 115. – I. 3. – P. 205–206.

13. Бондарева Е.В., Стеценко Н.В. Статистическая обработка малых выборок в адаптивной физической культуре с использованием критерия Манна-Уитни // *Математическая физика и компьютерное моделирование.* – 2017. – Т. 20. – № 4. – С. 39–42.

14. Ollier M., Talle V., Brisset A.L. [et al.]. QTL mapping and successful introgression of the spring wheat-derived QTL *Fhb1* for *Fusarium* head blight resistance in three European triticale populations // *Theor. Appl. Genet.* – 2020. – V. 133. – P. 457–477. DOI: org/10.1007/s00122-019-03476-0

15. Haberer, G., Kamal, N., Bauer, E. [et al.]. European maize genomes highlight intraspecies variation in repeat and gene content // *Nature Genetics.* – 2020. – V. 52. – P. 950–957. DOI: org/10.1038/s41588-020-0671-9

16. Звягин А.С. Выделение ДНК из гербарных листьев *Vitis vinifera* L. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2010. – № 58. – С. 436–447.

References

1. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbari-

um and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985. – V. 5. – P. 69–76.

2. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11–15.

3. Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // PNAS. – 1984. – 81. – P. 8014–8018.

4. Vodchits N.V., Zaytseva I.O., Kirikovich I.G. [i dr.]. Sravnitel'nyy analiz metodov ekstraktsii obshchey genomnoy DNK golubiki vysokorosloy // Vestnik Poleskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskikh nauk. – 2014. – № 2. – S. 25–30.

5. Balanovskiy O.P., Kagazezheva Zh.A., Ol'kova M.V. Metody izmereniya kontsentratsii DNK: sovpadenie otnositel'nykh velichin i razlichiya absolyutnykh // Vestnik RGMU. – 2019. – № 3. – S. 27–33. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.043.

6. Aukenov N.E., Masabaeva M.R., Khasasnova U.U. Vydelenie i ochistka nukleinykh kislot. Sostoyanie problemy na sovremennom etape // Nauka i zdavookhraneniye. – 2014. – № 1. – S. 51–53.

7. Dimitrijević A. Pejović I., Imerovski I., Dedić B., Pajević S., Miladinović D. DNA isolation from dry samples of broomrape – the effect of isolation method and sample storage on DNA yield and quality // Romanian agricultural research. – 2013. – No. 30. – P. 349–357.

8. Petrov D.G., Makarova E.D., Germash N.N., Antifeev I.E. Metody vydeleniya i ochistki DNK iz lizatov kletok (obzor) // Nauchnoe priborostroeniye. – 2019. – T. 29. – № 4. – S. 28–50.

9. Bulavin I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., Mitrofanova I.V., Zhdanova I.V., Khokhlov Yu.S. The quality of the DNA isolated from *Lavandula angustifolia* leaves // Acta Horticulturae. – 2020. – Vol. 1298. – S. 563–568. DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1298.77

10. Antonova T.S., Guchetl S.Z., Tchelustnikova T.A., Ramasanova S.A. Development of marker system for identification and certification of sunflower lines and hybrids on

the basis of SSR-analysis // Helia. – 2006. – Vol. 29. – No. 45. – P. 63–72.

11. Opređenje sortovoy prinadlezhnosti semyan soi na osnove mikrosatelitnogo analiza: metodicheskie rekomendatsii / Volkov V.A., Vayman A.V., Potokina E.K. Federal'nyy issledovatel'skiy tsentr Vserossiyskiy institut geneticheskikh resursov rasteniy im. N.I. Vavilova. – SPb, 2017. – 19 s.

12. Vroh Bi I., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai P. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction // Plant breeding. – 1996. – V. 115. – I. 3. – P. 205–206.

13. Bondareva E.V., Stetsenko N.V. Statisticheskaya obrabotka malykh vyborok v adaptivnoy fizicheskoy kul'ture s ispol'zovaniem kriteriya Manna-Uitni // Matematicheskaya fizika i komp'yuternoe modelirovaniye. – 2017. – T. 20. – № 4. – S. 39–42.

14. Ollier M., Talle V., Brisset A.L. [et al.]. QTL mapping and successful introgression of the spring wheat-derived QTL *Fhb1* for Fusarium head blight resistance in three European triticale populations // Theor. Appl. Genet. – 2020. – V. 133. – P. 457–477. DOI: org/10.1007/s00122-019-03476-0

15. Haberer, G., Kamal, N., Bauer, E. [et al.]. European maize genomes highlight intraspecies variation in repeat and gene content // Nature Genetics. – 2020. – V. 52. – P. 950–957. DOI: org/10.1038/s41588-020-0671-9

16. Zvyagin A.S. Vydelenie DNK iz gerbarnykh list'ev *Vitis vinifera* L. // Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2010. – № 58. – S. 436–447.

Получено/Received

18.03.2021

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed

22.03.2021

Получено после доработки/Manuscript revised

23.03.2021

Принято/Accepted

25.03.2021

Manuscript on-line