

**Сравнение эффективности методов экстракции ДНК из растительных объектов на примере лука репчатого (*Allium cepa* L.)**

**Научный руководитель – Усатов Александр Вячеславович**

***Митюков Владислав Дмитриевич***

*Студент (бакалавр)*

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия

*E-mail: vlados.mc18@gmail.com*

Эффективное выделение ДНК может представлять некоторую сложность ввиду наличия в растениях различных вторичных метаболитов, таких как полисахариды и полифенолы, затрудняющих дальнейший анализ. Поэтому наиболее подходящим материалом для выделения ДНК являются молодые листья, с наименьшим содержанием вторичных метаболитов. Однако в большинстве случаев приходится работать с другими частями растения, например с плодами и луковицами, в которых содержится огромное количество полисахаридов и полифенолов. Стоит отметить, что исследования в этой области немногочисленны, и существующие протоколы экстракции для растительных объектов не охватывают весь спектр растительных культур. Поэтому цель данной работы - сравнение эффективности методов экстракции ДНК из «сложных» растительных объектов на примере лука репчатого.

Материалом исследования служили растения лука репчатого. Для исследования влияния различных лизирующих буферов и органических компонентов на количество и качество ДНК, выделенной из сочных чешуй лука, мы сравнивали три лизирующих буфера: в буфере №1 использовали 2% СТАВ, в буфере №2 - 2% SDS, №3 - 4 М гуанидиний тиоцианат, остальные компоненты буферов оставались неизменными: 1% PVP; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM EDTA; 0.1%  $\beta$ -меркаптоэтанол. После лизаты очищались фенол-хлороформом, либо чистым хлороформом, либо без очистки в конце осаждались в изопропанол. Также для сравнения использовали набор DNeasy Plant mini Kit (Qiagen). В итоге нами было проверено 10 различных вариантов экстракции.

Количество выделенной ДНК определяли флуориметром QuantiFluor (Promega), методом ПЦР в режиме реального времени нами была установлена активность ДНК матрицы, для этого использовали праймеры на однокопийные гены хлоропластной, митохондриальной и ядерной ДНК.

В результате было установлено, что наибольшее количество ДНК удалось выделить с помощью лизирующего буфера №2 и №3 - в среднем 85 нг/мкл; наименьшее количество - буфером №1 (57 нг/мкл, в случае отсутствия очистки). Интересно отметить, что после увеличения количества промываний хлороформом отмечена потеря ДНК (примерно 10-20 нг/мкл за отмывку), однако чистота ДНК значительно увеличилась.

Таким образом, разные способы очистки не оказали влияния на финальные концентрации ДНК по сравнению друг с другом, но значительно отличались по качеству - в результате хлороформной очистки образцы получались чище. При сравнении чистоты выделения различных буферов наилучший результат показал буфер №1. Вероятнее это связано с тем, что буфер №2 и №3 предназначены в первую очередь для очистки от белков и липидов, а не от полисахаридов [1]. Коммерческий набор, напротив, показал не лучшие результаты по сравнению с остальными - 25 нг/мкл выделенной ДНК и низкую

эффективность ПЦР. Возможно, это связано с тем, что универсальность наборов приводит к значительной потере качества.

Так как количество и качество выделенной ДНК зависит еще от концентрации различных солей в лизирующем буфере [1], то в дальнейшем планируется определение оптимального состава буфера для экстракции ДНК из растительных объектов с повышенным содержанием полисахаридов и полифенолов.

#### **Источники и литература**

- 1) Xia Y. et al. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean // Bioscience reports. – 2019. – Т. 39. – №. 2.