

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ МАТЕРИАЛА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ПЦР

Солодянкин А.С., Сапко С.А., Герилович А.П.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г Харьков

Одним из основных направлений развития биотехнологии является сельскохозяйственная биотехнология, быстрые темпы развития которой обусловлены стоящими перед ней задачами. Среди ряда исследований выполняемых в этом направлении особое место занимает создание новых сортов растений путем генетических модификаций. Эти технологии позволяют получать культуры, устойчивые к насекомым-вредителям, вирусам, гербицидам, изменять вкусовые качества и внешние признаки [1]. Однако, несмотря на перспективность использования ГМО-продукции, существует целый ряд биологических рисков при ее бесконтрольном внедрении и использовании. К этим рискам относятся возможность передачи генов устойчивости к диким видам, неожиданные изменения качества продуктов питания (например, появление токсических свойств) [2]. Наряду с вышеперечисленными видами биологических рисков, в настоящее время международными экспертами рассматривается угроза продовольственного терроризма, связанная с возможностями преднамеренного создания генно-модифицированных организмов, способных причинить вред здоровью людей и животных [3]. В связи с этим, 29 февраля 2000 г. был ратифицирован Картахенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии, предполагающий системный усиленный контроль за распространением и использованием ГМО культур.

Основным методом контроля материала растительного происхождения на предмет генетических вставок является анализ экстрагированной ДНК методом ПЦР [4].

Одним из важнейших этапов генетического контроля является выделение нуклеиновых кислот. При работе с растительным материалом широкое распространение получили методики с использованием бромистого цетилтриметиламмония (СТАВ) в качестве лизирующего компонента с последующей отмывкой ДНК фенол-хлороформом и переосаждением этиловым спиртом. Являясь сильным детергентом СТАВ хорошо разрушает клеточную стенку растений, позволяя качественно экстрагировать геномную ДНК. Основным недостатком предлагаемых методов является высокая трудоемкость. Steven H. Rogstad предложил комбинированный метод, отличительной особенностью которого является сорбция ДНК на диоксид кремния с последующим осаждением образовавшихся комплексов путем центрифугирования. Однако, несмотря на модификацию он также достаточно неудобен для рутинных исследований, поскольку он разрабатывался для выделения больших объемов геномной ДНК [5, 6].

Исходя из вышесказанного, при выполнении данной работы была поставлена задача создания экспресс-метода экстракции геномной ДНК из материала растительного происхождения для анализа в ПЦР.

Материалы и методы. Для выделения ДНК нами использовались ГМО-содержащие субстраты:

- 1) соевый экзудат;
- 2) комбикорм;
- 3) соя;
- 4) кукуруза;
- 5) стандартный образец сои ERM-BF410d, содержащий 1 % генно-модифицированной сои (референс-лаборатория по контролю ГМО, г. Испра, Италия).

Для приготовления лизирующего буфера смешивали 1 г СТАВ; 14 мл 5 М NaCl, 25 мл 2 М Tris-HCl (pH 8), 20 мл 0.5 М EDTA (pH 8), доводили объем дистиллированной водой, свободной от нуклеаз, до 50 мл.

Для приготовления сорбента в мерную колбу вносили 6 г SiO₂, доводили объем дистиллированной водой, свободной от нуклеаз, до 50 мл, тщательно перемешивали и оставляли на 24 часа. По истечении времени удаляли 43 мл надосадочной жидкости и вновь доводили оставшийся объем дистиллированной водой, свободной от нуклеаз, до 50 мл. После этого тщательно перемешивали и оставляли на 8 часов. После образования осадка удаляли 44 мл надосадочной жидкости; добавляли 60 мкл HCl и перемешивали.

Для приготовления отмывочного раствора (70 % этанол с добавлением 10 мМ NaCl) смешивали 73,68 мл 95 % EtOH, 0,25 мл 4М NaCl и доводили объем дистиллированной водой, свободной от нуклеаз, до 100 мл.

Для приготовления раствора для финальной отмывки смешивали 33,3 мл изопропанола и 16,7 мл хлороформа.

Постановку ПЦР проводили с праймерами nos Term f (5'cgatgacgtttatgatgagatggg3') и nos Term r (5'gacaccgcgcgcgataattatcc3'), фланкирующими участок длиной 118 пар нуклеотидов NOS терминатора.

Результаты и обсуждения. В качестве основного компонента в лизирующем растворе нами было решено использовать СТАВ, который, являясь сильным катионным детергентом за счет неустойчивой связи с бромом (рис. 1), хорошо разрушает клеточные стенки и ядра, образуя при этом связь с ДНК. При этом, комплекс СТА-ДНК хорошо растворим в средах с высоким содержанием солей (например > 1М NaCl), что позволяет провести очистку СТА-ДНК комплекса от грубых механических примесей с помощью ультрацентрифугирования.

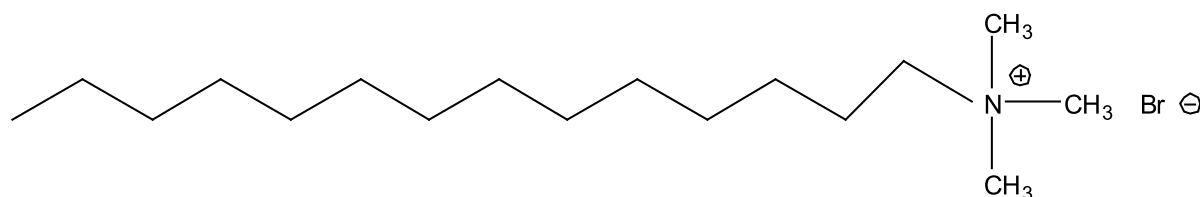


Рис. 1 Химическая формула цетилтриметиламмония бромистого.

Для сорбции ДНК из лизирующего раствора нами были использованы частицы диоксида кремния (SiO₂). В растворах с высокой ионной силой, происходит замещение H₂O в гидратированных молекулах SiO₂ ионами (в данном случае положительно заряженными ионами Na). При этом образуется связь с сахарофосфатными остовами молекул ДНК, что позволяет осадить SiO₂-ДНК комплексы центрифугированием (рис 2).

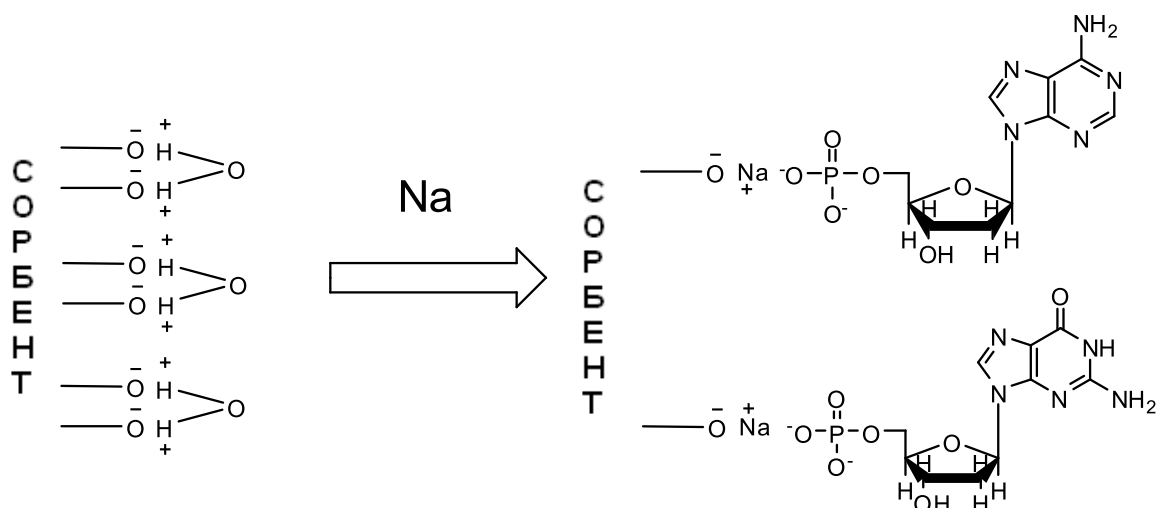


Рис. 2 Механизм сорбции ДНК на SiO_2 в присутствии ионов Na .

После осаждения из лизирующего раствора комплекса ДНК- SiO_2 , нами проводилась отмывка сорбента от белков и липидов отмывочным раствором, основу которого составил 70 % этанол.

На стадии финальной отмывки нами было решено использовать хлороформ, что позволило избавиться от СТА-молекул и остатков белков и липидов, значительно повышая «качество» ДНК. В ряде современных коммерческих протоколов при выделении ДНК ограничиваются двукратной промывкой SiO_2 -ДНК 70 % алкогелем, однако, присутствие хлороформа в растворе для финальной отмывки значительно упростило этап подсушивания сорбента.

В качестве элюента ДНК нами был использован ТЕ-буфер. В результате попадания комплекса SiO_2 -ДНК в раствор с низкой ионной силой, происходил разрыв связей между молекулами ДНК и SiO_2 . В связи с этим допускается замена ТЕ-буфера деионизированной водой. Полученная таким способом надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК и использовалась нами для анализа в ПЦР.

Результаты проведения электрофореза представлены на рисунке 3. Как видно из фореграммы ПЦР прошла со всеми образцами выделенной ДНК, о чем говорит образовавшийся специфический фрагмент длиной 118 пар нуклеотидов.

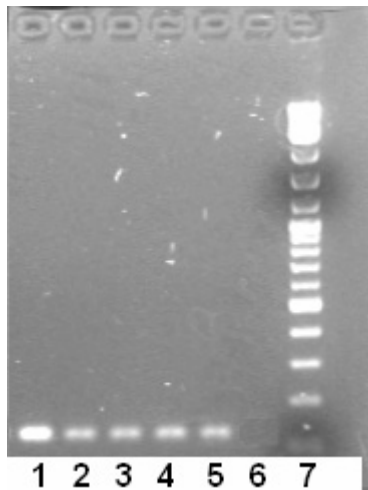


Рис. 3. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента NOS терминатора:

- 1) соевый экстракт;
- 2) комбикорм;
- 3) соя;
- 4) кукуруза;
- 5) стандартный образец сои ERM-BF410d, содержащий 1% генно-модифицированной сои;
- 6) отрицательный образец;
- 7) маркер молекулярного веса.

В результате работы для экстракции ДНК из материала растительного происхождения нами был предложен следующий протокол:

1. В пробирки типа эппендорф внести по 0,15 г исследуемого материала. Добавить по 500 мкл лизирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе.
2. Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 37°C в течении одного часа.
3. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течение 10 минут.

4. Надосадочную жидкость перенести в новые пробирки.
5. Добавить по 25 мкл сорбента, тщательно перемешать на вортексе, инкубировать 10 минут при комнатной температуре периодически встряхивая на вортексе.
6. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течение 30 секунд.
7. Удалить надосадочную жидкость, добавить по 500 мкл отмывочного раствора. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе.
8. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течении 30 секунд.
9. Повторить п. 7-8.
10. Удалить надосадочную жидкость, добавить по 500 мкл раствора для финальной отмывки. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе.
11. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течении 30 секунд.
12. Удалить надосадочную жидкость, инкубировать пробирки в твердотельном термостате с открытыми крышками при температуре 65°C в до подсушивания сорбента (5-10 минут).
13. Добавить по 50 мкл ТЕ-буфера, тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе.
14. Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 65°C в течении 10 минут периодически встряхивая на вортексе.
15. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течение 60 секунд. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК и готова для анализа в ПЦР.

Следует отметить, что особое внимание необходимо уделять подготовке материала к исследованию. Тщательно проведенная гомогенизация значительно увеличивает финальный выход ДНК.

Таким образом, нами был разработан экспресс-метод экстракции ДНК из тканей растительного происхождения, позволяющий эффективно и быстро выделять материал для исследований в ПЦР.

Выводы.

1. Разработан протокол экстракции ДНК из тканей растительного происхождения, включающий лизис клеток бромистым цетилтриметиламмонием, сорбцию ДНК на диоксид кремния, двукратную отмывку сорбента 70 % этанолом, финальную отмывку раствором, содержащим хлороформ, и элюцию ДНК в раствор с низкой ионной силой.

2. Эффективность использования данного протокола подтверждена путем постановки ПЦР с праймерами pos Term f и pos Term g, фланкирующими участок длиной 118 пар нуклеотидов NOS терминатора с ДНК экстрагированной из соевого экстракта, комбикорма, сои и кукурузы.

Список литературы

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология [Текст] / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
2. Игнатъев, И. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности [Текст] / Игнатъев И., Тромбицкий И., Лозан А. – Кишинев.: Экоспектр-Бендеры, 2007. – 60 с.
3. Terrorist Threats to Foods. Guidance for Establishing and Strengthening Prevention and Response Systems: In the "Food safety issues" series, Food Safety Department, World Health Organization, Geneva. – 2002. – 45 p.
4. ISO 21570:2005 provides the overall framework of quantitative methods for the detection of genetically modified organisms (GMO) in foodstuffs, using the polymerase chain reaction (PCR).
5. DNA Extraction From Plants: The Use of Pectinase [Text] / H. Steven [at al] // Plant Molecular Biology Reporter. – 2001. – №19. – P. 353-359.
6. Rogstad, Steven H. DNA Plant DNA Extraction Using Silica [Text] / Steven H. Rogstad // Plant Molecular Biology Reporter. – 2003. – №21. – P. 463a-463g.

DEVELOPMENT OF A RAPID-EXTRACTION METHOD OF DNA FROM MATERIAL OF PLANT ORIGIN FOR GENETIC ANALYSIS IN THE PCR

Solodyankin A.S., Sapko, S.A., Gerilovych A.P.

National Science Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

The article presents the results of express-method development for DNA extraction from plant material for genetic analysis by PCR-based cell lysis cetyltrimethylammonium bromide with further sorption of DNA on silicon dioxide. The results confirm the efficacy of this technique.

УДК 591.555.3:591.57

ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ КОНТРОЛЮВАННЯ АДЕНОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ КУРЕЙ ПЕРШОГО СЕРОТИПУ НА ОСНОВІ ІФА

Стегній Б.Т., Антонов В.С., Руденко О.П., Коваленко Л.В., Михайлова С.А., Ткаченко С.В., Усова Л.П.

ННЦ «ІЕКВМ», м. Харків

Семенченко О.Ю.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

У зв'язку з поширенням інфекційних хвороб тварин питання біологічної безпеки є важливою складовою національної безпеки нашої держави. Істотне місце в системі біологічної безпеки займає наукове забезпечення протиепізоотичних заходів, однією зі складових якого є розробка і впровадження діагностиків на основі ІФА. Метою наших досліджень було отримати компоненти для тест-системи щодо визначення антитіл до авіадемовірусу першого серотипу.

Авіадемовірусна інфекція курей першого серотипу (AIBIK) — інфекційне захворювання переважно курчат, що характеризується розладами органів респіраторної та травної систем, ураженням серцево-судинної системи, органів яйцетворення [1]. У промисловому птахівництві досить часто аденовіруси, зокрема AIBIK, виступають у ролі вторинного фактору при інших інфекційних захворюваннях. Завдяки вертикальній передачі, авіадемовіруси контамінують курячі ембріони, що є перешкодою для використання цих ембріонів з метою репродукції інших вірусів.