

ОТРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОДА *BACILLUS*

А.А. Скромова, 3 курс

*Научный руководитель – Н.В. Водчиц, зав. отраслевой лабораторией «ДНК
и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве»*

Полесский государственный университет

Введение. В настоящее время молекулярные методы анализа на основе ДНК становятся обычными способами обнаружения, идентификации и количественного определения микроорганизмов [1].

Выделение ДНК – необходимый шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие биохимические процессы, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, гибридизация не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительного выделения и очистки нуклеиновой кислоты.

Существует большое количество методов получения ДНК из бактерий, и в зависимости от поставленной задачи нужно выбрать наиболее оптимальную методику [4].

Повсеместно распространенные в природной среде бактерии рода *Bacillus*, способные продуцировать во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений, являются перспективными объектами биотехнологии [2]. Установление точной таксономической принадлежности и наличие полной нуклеотидной последовательности генома этих микроорганизмов позволяет целенаправленно изменять их свойства для биотехнологического использования [3].

Целью работы: подбор оптимального способа экстракции тотальной ДНК из образцов бактерий рода *Bacillus*.

Методика и объекты исследования. Исследования были проведены на базе отраслевой лаборатории «ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве» биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ). В качестве исследуемых объектов использовали бактерии рода *Bacillus*: *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*, выделенные из бактериальных препаратов Фитоспорин - М и Лепидоцид™ П на базе микробиологической лаборатории БТФ ПолесГУ.

Для культивирования микроорганизмов использовали жидкую питательную среду типа LB. Инкубировали при температуре 30°C в течении 72 ч [7].

Для выделения нуклеиновой кислоты использовали фенол-хлороформный метод выделения ДНК из бактериальных клеток (классический) [9] и модифицированную методику, преобразованную во время эксперимента. ДНК выделяли из свежих культур на вторые сутки роста [6]. Во избежание ошибочных заключений проведено 3-кратное повторение процедуры выделения ДНК каждой методикой.

Точное измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм.

Результаты и их обсуждение. Для получения накопительной культуры нами был использован метод десятикратных разведений с последующим высевом на твердую питательную среду LB и культивированием в течении 72 ч [7]. Идентификацию видов проводили с помощью биохимических тестов (окраска по Граму; каталазный тест и др.) и микроскопирования [5]. В результате удалось выделить два чистых вида микроорганизмов: *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*.

Для выделения ДНК мы применили и сравнили две методики: фенол-хлороформный метод выделения ДНК (классический) [9] и модифицированную методику.

В таблице приведены спектрофотометрические данные исследования чистоты и концентрации ДНК образцов, выделенных двумя способами.

Таблица – Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК

Вид бактерии	Классическая методика		Модифицированная методика	
	Концентрация ДНК, нг/мкл	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$	Концентрация ДНК, нг/мкл	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$
<i>Bacillus subtilis</i>	68.5	1.55	132.4	2.08
	157.1	1.69	265.6	2.08
	86.2	1.63	223.5	2.06
<i>Bacillus thuringiensis</i>	102.9	2.27	338.6	2.06
	72.5	1.48	318.1	2.07
	87.6	1.60	353.5	2.07

Применяя фенол-хлороформный метод выделения ДНК (классический) мы смогли получить ДНК удовлетворительной концентрации, но с низкой очисткой.

В случае с модифицированной методикой, удалось выделить ДНК высокой концентрации с хорошей степенью очистки. Наиболее высокая концентрация для *Bacillus subtilis* составила 265.6 нг/мкл, для *Bacillus thuringiensis* составила 353.5 нг/мкл, при этом все образцы были с хорошей очисткой.

В основе классического фенол-хлороформного метода лежит принцип разделения фаз раствора ДНК и фенол-хлороформной смеси и в удалении вместе с последней фазой белков и полисахаридов [10]. В классической методике фенол действует как эффективный депротеинизирующий агент, разрушающий клетки и денатурирующий белки. Для эффективного отделения высокомолекулярной ДНК сначала производится фенол-хлороформная экстракция, а затем две хлороформные экстракции (С1А) для одновременного удаления белков, липидов и других органических примесей из раствора, содержащего нуклеиновые кислоты [9]. При отработке методики мы использовали водонасыщенный фенол без хлороформа, так как в литературных источниках рекомендуют этот реагент на данном этапе при выделении ДНК из клеток, содержащих белок в значительных концентрациях [10].

Во многих протоколах выделения нуклеиновых кислот применяют соли ацетата аммония, натрия, калия, так как они образуют комплекс с ДНК и осаждают ее. Нами был выбран ацетат аммония, при использовании которого массовый выход ДНК больше и при промывании осадка спиртом следов соли не остается. Хлорид натрия, в свою очередь, при плохой очистке образцов является ингибитором процесса ПЦР [11].

Выводы. Выделенная ДНК из бактерий рода *Bacillus*, с помощью модифицированной фенол-хлороформной методики, отличается высокой очисткой и концентрацией. В дальнейшем данный протокол можно применять при работе с грамположительными бактериями. Негативным фактором является использование токсичных веществ, которые вредны для здоровья человека.

Список использованных источников

1. Петров, Д. Г. Методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток (обзор) / Д. Г. Петров [и др.] // Научное приборостроение физико-химической биологии. – 2019. – Т. 29, № 4. – С. 28–50.
2. Валентович, Л. Н. Молекулярно-генетическая идентификация биотехнологически значимых бактерий рода *Bacillus* / Л. Н. Валентович [и др.] // Вестн. НАН Беларуси, Ин-т микробиологии. – 2014. – Т. 58, №1. – С. 85–88.
3. Лагодич, А. В. Характеристика плазмид природных штаммов *Bacillus subtilis* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.26 / А. В. Лагодич ; Белорус. Гос. ун-т. – Минск, 2005. – 130 с.
4. Степина, Т. А. Исследование гена 16S рРНК различных микроорганизмов : дис. ... канд. биол. наук : 06.00.01 / Т. А. Степина. – М., 2016. – 77 л.
5. Чубенко, Г. И. Методы идентификации бактерий : метод. пособие / Г. И. Чубенко. – Благовещенск : Амурская ГМА, 2018. – 44 с.
6. Глинская, Н.А. Методы работы с ДНК : метод. пособие / Н. А. Глинская [и др.] – Пинск : Полес. гос. ун-т, 2018. – 86 с.
7. Герхардт, Ф. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт // Пер. с англ. под ред. Е. Н. Кондратьевой, Л. В. Калакуцкого : в 3 т. – Москва : Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
8. Герхардт, Ф. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт // Пер. с англ. под ред. Е. Н. Кондратьевой, Л. В. Калакуцкого : в 3 т. – Москва : Мир, 1983. – Т. 3. – 264 с.
9. Антонова, О. С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) / О. С. Антонова [и др.] // Научное приборостроение физико-химической биологии – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 3–9.
10. Selli, C. Introducing basic molecular biology to Turkish rural and urban primary school children via hands-on PCR and gel electrophoresis activities / C. Selli [et al.] // Biochemistry and molecular biology education. – 2014. – 42(2). – P. 114–20.
11. Маниатис, Т. А. Молекулярное клонирование / Т. А. Маниатис [и др.] // Пер. с англ. под ред. А. А. Баева, Скрыбина К. Г. – Москва : Мир, 1984. – 479 с.