

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ (В ЖИВОТНОВОДСТВЕ, РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, АКВАКУЛЬТУРЕ, МЕДИЦИНЕ И ГЕНЕТИКЕ)

УДК 577.21:597.5

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АКВАРИУМНЫХ РЫБ

И.А. Авдеев, 4 курс

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

Полесский государственный университет

Актуальность. Вопрос безопасности генетически модифицированных организмов (далее ГМО) для человека и окружающей среды, становится все более острым [1]. Сейчас для его разрешения используется огромное количество молекулярно-биологических методов исследования.

Выделение ДНК первый и наиболее важный этап, от качества которого зависит успех дальнейших этапов и окончательный результат работы. Существует большое количество методов экстракции ДНК, и в зависимости от объекта и задач нужно выбрать наиболее оптимальный, позволяющий получить чистую нуклеиновую кислоту, пригодную для исследования [2, с. 81].

Цель работы: сравнить результаты солевого и фенол-хлороформного методов экстракции ДНК из тканей генетически модифицированных рыб.

Материалы и методы. Исследования были проведены на базе отраслевой лаборатории «ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве», биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет». В качестве объекта использовались замороженные ткани ГМО: рыбы рода *Danio*: *Danio glofish*, рыбы рода *Puntigrus*: *Puntigrus tetrazona glofish*, рыбы рода *Ternetzi*: *Gymnocorymbus ternetzi glofish* купленные в зоомагазине Garfield города Минска.

Для выделения нуклеиновой кислоты применяли два метода: солевой [3, с. 4692] и фенол-хлороформный [4, с. 51].

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

Приблизительную оценку качества выделенных нуклеиновых кислот проводили на электрофореze в 0,8% агарозном геле, в трис-боратном буфере при основном напряжении 70 V в течении 30 минут.

Результаты и обсуждение. В основе солевого метода лежит агрегация нуклеиновых кислот в присутствии 70% этилового спирта и соли – хлорида натрия. Положительно заряженные ионы соли нейтрализуют отрицательный заряд на сахаро-фосфатном скелете ДНК, приводя к снижению растворимости последних в воде [5, с. 14].

В основе же фенол-хлороформного метода лежит разделения двух фаз: органической (фенол, хлороформ и гидрофобные липиды) и водной, в которой растворены нуклеиновые кислоты. Причиной этому является разница в плотности фенола, смешенного с хлороформом, и воды [6].

В таблице приведены спектрофотометрические данные исследования чистоты и концентрации ДНК образцов.

Таблица – Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК рыбы

№ образца	Исследуемый объект	Фенол-хлороформная экстракция		Солевая экстракция	
		Концентрация (нг/мкл)	Очистка ($\lambda 260/\lambda 280$)	Концентрация (нг/мкл)	Очистка ($\lambda 260/\lambda 280$)
1	<i>Danio glofish</i>	38,6	1,82	400,5	1,27
2	<i>Gymnocorymbus ternetzi glofish</i>	19,6	1,88	518,8	1,65
3	<i>Puntigrus tetrazona glofish</i>	22,3	1,54	514,3	1,70
Среднее		26,8	1,74	477,9	1,54

Самая высокая концентрация ДНК, полученной солевым методом, составила – 518,8 нг/мкл; а наименьшая 400,5 нг/мкл. Степень очистки не поднималась выше 1,70 и в среднем была равна – 1,54, что свидетельствует о примесях в образцах. Пик поглощения приходился на длину волны 230 нм (рисунок 1 А), что характерно для органических соединений и хаотропных солей [7].

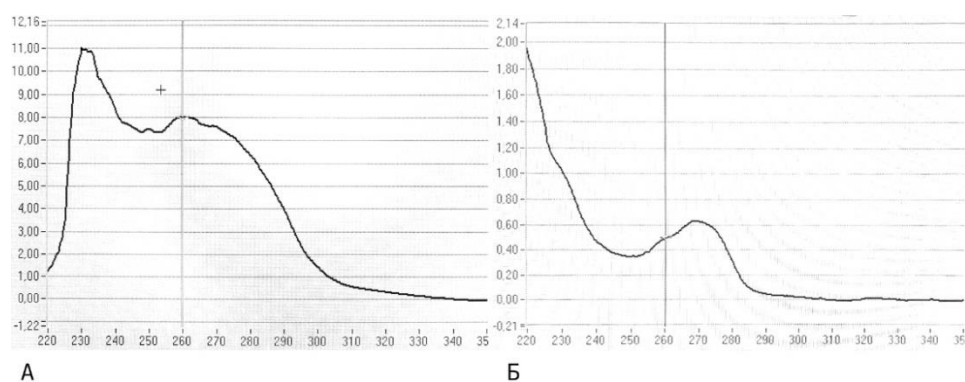


Рисунок 1. – Спектры поглощения и чистоты ДНК из тканей рыбы: *Danio glofish*, выделенной (А) – солевым методом, (Б) – фенол-хлороформным методом.

ДНК после осаждения имела цвет аналогичный цвету флуоресцентных белков рыб. Вероятной причиной этого может быть невозможность разрушить все органические соединения, содержащиеся в генетически модифицированных рыбах [5, с. 14].

Данные, полученные после фенол-хлороформной экстракции ДНК, показали, что самая высокая концентрация составила – 38,6 нг/мкл; а наименьшая – 19,6 нг/мкл. Насыщенность во всех случаях достаточно низкая, возможно фенол и хлороформ из-за высоких молярности привели к частичному разрушению ДНК [4, с. 51]. Степень очистки высокая в двух первых образцах, а в третьем достаточно низкая, вероятно, из-за примеси фенола [8]. Он виден на спектрофореграмме (рисунок 1 Б), как пик на длине волны 270 нм. Фенол мог попасть в пробирку Эппендорфа, из-за нарушения забора пипеткой водной фазы. ДНК после осаждения цвета не имела.

На рисунке 2 представлена электрофореграмма образцов ДНК.

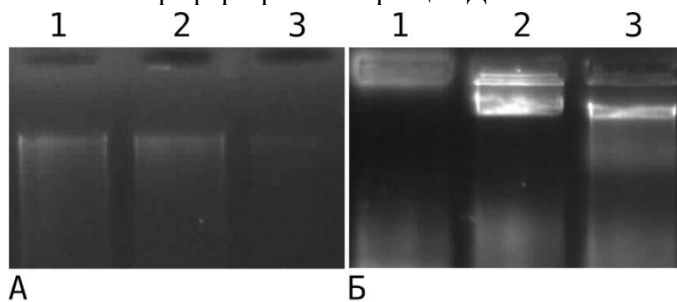


Рисунок 2 – Электрофореграмма образцов ДНК, выделенных из тканей рыбы: (А) – фенол-хлороформный метод; (Б) – солевой метод.

1 – *Danio glofish*; 2 – *Gymnocorymbus ternetzi glofish*; 3 – *Puntigrus tetrazona glofish*

Электрофореграмма образцов, полученных фенол-хлороформным методом, показала, что после связывания с бромистым этидием, ДНК светилась в виде нечеткой полосы, не смазанной по длине дорожки, что говорит о невысокой концентрации и приемлемой очистке молекул в препарате (рисунок 2 А).

На электрофореграмме образцов, полученных солевым методом, свечение в первой лунке указывает на наличие тяжелых, малофрагментированных фракций ДНК. Остальные полосы яркие, но смазанные по длине дорожки, что говорит о высокой концентрации, но невысокой очистке молекул в препарате (рисунок 2 Б).

Выводы. Использование фенол-хлороформного метода для выделения нуклеиновых кислот из тканей генетически модифицированных рыб в дальнейшем возможно, так как позволяет очистить ДНК в достаточной степени. Однако концентрация ДНК довольно низкая. В свою очередь классический солевой метод дает высокий выход ДНК, но неспособен очистить образцы от всех органических примесей.

Список использованных источников

1. Наука и история ГМО и других процессов модификации пищевых продуктов [Электронный ресурс] // Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. – Режим доступа: <https://www.fda.gov>. – Дата доступа: 08.03.2023.
2. Бадзюк, И. Л. Анализ современных методов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы / И. Л. Бадзюк [и др.] // Иркутск: Восточно-Сибирский институт МВД РФ. – 2012. – № 1. – С. 81–89.
3. Aljanabi, S. M. Universal and rapid salt extraction of high-quality genomic DNA for PCR – based techniques / S. M. Aljanabi, I. Martinez // Nucl. Acids Res. – 1997. – Vol. 25 (20). – P. 4692–4693.
4. Розумец, А. В. Сравнение методов выделения ДНК из тканей африканского клариевого сома / А. В. Розумец [и др.] // Биотехнология: достижения и перспективы развития : материалы III Междунар. науч.-практ. конф., Пинск, 22–23 ноября 2018 г. / Полесский гос. ун-т ; редкол. : Шебеко К. К. [и др.]. – Пинск, 2018. – С. 50–53.
5. Ведерников, В. Е. Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот / В. Е. Ведерников // Журнал «Лаборатория» – 2012. – №4. – С. 14–15.
6. Phenol Chloroform DNA Extraction: Basics, Preparation of Chemicals and Protocol [Электронный ресурс] // Genetic Education Learn Genetics. – Режим доступа: <https://geneticeducation.co>. – Дата доступа: 08.03.2023.
7. Методы оценки качества нуклеиновой кислоты, получаемой в процессе выделения [Электронный ресурс] // SILEKS. – Режим доступа: <https://sileks.com>. – Дата доступа: 08.03.2023.
8. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual / J. Sambrook, D. W. Russell. – 2. ed. – Texas : Cold Spring Harbor Laboratory. Press, 1989. – 2222 s.