¹И. В. Булавин, нс лаб. геномики растений и биоинформатики, к.б.н.

¹В. А. Браилко, зав. лаб. геномики растений и биоинформатики, к.б.н.

¹О. А. Гребенникова, снс лаб. геномики растений и биоинформатики, к.б.н.

¹М. С. Андреев, мнс лаб. геномики растений и биоинформатики

^{1,2}О. В. Кривенко, внс лаб. геномики растений и биоинформатики, к.б.н.

¹И. В. Митрофанова, зав. отделом биологии развития растений,
биотехнологии и биобезопасности, д.б.н.

¹ФГБУН «НБС-ННЦ», Россия, Республика Крым, г. Ялта

²ФИЦ ИнБЮМ, Россия, Республика Крым, г. Севастополь

labgennbs@yandex.ru

УДК: 635.71+577.113.083

DOI 10.31676/2073-4948-2019-59-286-293

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОММЕРЧЕСКИХ НАБОРОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ЛАВАНДИНА (*LAVANDULA* × *INTERMEDIA* *EMERIC EX LOISEL.*)

Реферат. В статье описаны результаты выделения геномной ДНК из листьев лавандина сорта Рабат с использованием готовых коммерческих наборов. Приведены данные концентрации ДНК и ее качества, полученные спектрофотометрическим анализом, методом электрофореза в агарозном геле и с использованием автоматизированной системы для электрофореза Agilent 4200 TapeStation. Сделаны выводы о предпочтительном применении набора NucleoSpin® Plant II Midi kit для выделения ДНК из листьев лавандина.

Ключевые слова: лавандин, сорт Рабат, ДНК, выделение, набор

Summary. The paper describes the results of the genomic DNA isolation from the Rabat variety lavandin leaves using ready-made commercial kits. The data on DNA concentration and its quality determined spectrophotometrically and by using agarose gel electrophoresis and automated electrophoresis system Agilent 4200 TapeStation are presented. Conclusions of suitable NucleoSpin® Plant II Midi kit for DNA isolation from lavandin leaves are made.

Keywords: lavandin, Rabat variety, DNA, isolation, kit

Введение

Получение высококачественной и чистой ДНК наряду с ее количественным выходом — необходимое условие для успешного выполнения любых молекулярно-генетических исследований. Качество ДНК оценивают в

Исследования выполнены на базе уникальной научной установки «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» (УНУ «ФИТОБИОГЕН») в рамках госзадания № 0829-2019-0038 ФГБУН «НБС-ННЦ».

Авторский коллектив благодарит куратора генофондовой коллекции лаванды, научного сотрудника лаборатории эфиромасличных растений ФГБУН «НБС-ННЦ» Ю. С. Хохлова за предоставленные для исследования растения, выращиваемые в открытом грунте, и младших научных сотрудников лаборатории биотехнологии и вирусологии растений С. В. Челомбит и И. В. Жданову за предоставленные для исследований микропобеги лавандина *in vitro*.

первую очередь по степени ее фрагментации и деградации. Получение недеградированной высокомолекулярной ДНК (средняя длина более 40 тыс. п. о.) особенно важно, если в дальнейшем она используется для секвенирования на основе высокопроизводительных методов последнего поколения (например, платформы от Pacific Bioscience и Oxford Nanopore Technologies). Чистота ДНК определяется отсутствием белков, полисахаридов и вторичных метаболитов, которые зачастую препятствуют выделению высокомолекулярной нуклеиновой кислоты (НК) [1, 2] и могут снижать эффективность проведения ПЦР, а также получение качественных библиотек для последующего секвенирования.

В связи с этим особо актуальным становится вопрос чистоты ДНК при проведении молекулярно-генетических исследований на лекарственных и эфиромасличных культурах, которые содержат значительные количества вторичных метаболитов [2, 3]. Одной из таких культур является лавандин – перспективное эфиромасличное растение, обладающее лекарственными, ароматическими и декоративными свойствами [4].

Целью данной работы было проведение первичной оценки количества и качества ДНК, выделенной из растительного материала лавандина при помощи различных коммерческих наборов («китов»).

Материалы и методы исследований

Исходным материалом служили растения лавандина сорта Рабат, выращиваемые в генофондовой коллекции Никитского ботанического сада (*ex situ*), и микропобеги, культивируемые *in vitro* в фитокапсулах «БИОТРОНА».

Сорт лавандина Рабат — вечнозеленый полукустарник семейства *Lamiaceae*. Сорт получен в 1993 г. методом межвидовой гибридизации от скрещивания *L. × intermedia* Emeric ex Loisel. (амфидиплоид $2n = 96$) с *L. angustifolia* (сорт Прима $2n = 48$). В условиях открытого грунта (рис. 1А) растение достигает 85-100 см и в диаметре составляет 90-105 см. Соцветие плотное, длиной 9-11 см, с 10 мутовками и с 22-26 цветками в мутовке. Число цветков в соцветии — до 250 шт. Листья удлинленно-ланцетные, длиной 7-10 см и шириной 9-11 мм, темно-зеленой окраски. Семена не завязывает, стерильный. Размножается вегетативно [7].

Полученные *in vitro* микропобеги лавандина сорта Рабат (рис. 1Б) путем введения апикальной меристемы пазушных почек на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга достигают при культивировании длины до 5 см, число листьев на микропобеги составляет 10-13 шт. [4]. Размер листовых пластинок — в среднем $1,5 \times 0,4$ см.

Для анатомических исследований препараты из листовых пластинок изготавливали согласно общепринятым методам [5]; для выявления эфирных масел в тканях листа срезы окрашивали суданом III и исследовали с помощью

светового микроскопа AxioScope A.1 (Zeiss, Германия) с программным обеспечением Axio Vision Rel applications 4.8.2.

Для выделения ДНК от стеблей и микропобегов отделяли неповрежденные молодые листья (20-200 мг). Навески переносили в ступки, замораживали в жидком азоте и гомогенизировали с использованием пестика. Измельченные ткани, не допуская их оттаивания, переносили в пробирки с необходимым лизирующим (экстрагирующим) буфером. Далее проводили процедуру выделения согласно протоколам производителей наборов DiamondDNATM (DiamondDNA, Россия), PureLink[®] Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Scientific[™], USA), GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific[™], USA), NucleoSpin[®] Plant II Midi kit (Macherey Nagel, Germany). Количество и качество ДНК оценивали спектрофотометрически (Implen NanoPhotometer NP80, Germany) при длинах волн A260, A280 и A230. Электрофорез в 1 %-ном агарозном геле проводили в 1x TBE буфере при 100 В 45 мин. Степень фрагментации ДНК оценивали с использованием автоматизированной системы для электрофореза Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, Германия). Эксперименты проводили в трех биологических повторностях, результаты обрабатывали статистически с использованием программного обеспечения PAST [6].

Рис. 1. Растения лавандина сорта Рабат, выращиваемые в условиях открытого грунта *ex situ* (А) и микропобеги, культивируемые *in vitro* (Б)

Результаты исследований

В результате анатомо-морфологической оценки состояния изучаемого растительного объекта было отмечено, что на срезах листьев лавандина *ex situ* и *in vitro* (рис. 2) различали эпидермис, покрытый кутикулой. Под эпидермисом

находился дифференцированный мезофилл с губчатой и столбчатой паренхимой. Трихомы и устьица располагались с двух сторон листовой пластинки. При окрашивании суданом III установлено накопление эфирного масла в мезофилле листа, покровных тканях, трихомах (рис. 2 Б). Визуально количество включений с эфирным маслом в листьях микропобегов *in vitro* было меньшим, чем в листьях растений *ex situ*.

Рис. 2. Накопление эфирных масел в тканях листьев лавандина сорта Рабат: А — *ex situ*, Б — *in vitro*; 1 — проводящий пучок, 2 — мезофилл листа, 3 — трихомы, 4 — включения с эфирными маслами в виде капель

В связи с различным накоплением эфирных масел в тканях листовых пластинок осуществляли выделение ДНК разными коммерческими наборами для получения НК высокого качества с целью осуществления последующих молекулярно-генетических анализов.

При исследовании качества ДНК навески из листьев лавандина варьировали от 20-30 мг (DiamondDNA) до 200 мг (NucleoSpin® Plant II Midi kit). Для растений *ex situ* набор DiamondDNA давал наибольший выход ДНК. Однако спектрофотометрически установлены значения $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ (табл. 1), при которых ДНК не считается «чистой».

Таблица 1.

Показатели эффективности выделения ДНК из листьев лавандина, выращиваемого *ex situ*

Набор/ Показатели	Diamond	Pure Link	GeneJet	Nucleospin
вес материала (мг)	25 ±1,5	102 ±4,5	100	206 ±1
$A_{260/280}$	1,4 ±0,1	1,8 ±0,01	1,8 ±0,01	1,8 ±0,02
$A_{260/230}$	0,69 ±0,04	1,2 ±0,1	2,0 ±0,1	2,3 ±0,11
концентрация ДНК (нг/мкл)	81,4 ±16,3	22,7 ±1,4	44,8 ±7,3	67,5 ±11,0

Согласно нашим результатам, наиболее эффективными наборами, позволяющими получить необходимое количество качественной НК из листьев лавандина, выращиваемых *ex situ*, оказались GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit и NucleoSpin® Plant II Midi kit.

Результаты относительно чистоты ДНК, выделенной из листьев лавандина, культивируемого *in vitro*, были подобны данным, полученным для НК из листьев растений *ex situ*. Отличительным было снижение в 1,8-2,0 раза количества ДНК, полученной при помощи PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, NucleoSpin® Plant II Midi kit, DiamondDNA (табл. 2).

Результаты, полученные спектрофотометрически, подтверждены электрофореграммами. В агарозном геле с ДНК, выделенной при помощи DiamondDNA (рис. 3 А), обнаруживается шлейф, что свидетельствует о контаминации другими веществами. НК, полученные при помощи других наборов (рис. 3 Б, В, Г) характеризовались большей чистотой.

Таблица 2.

Показатели эффективности выделения ДНК из листьев лавандина, культивируемого *in vitro*

Набор/ Показатели	Diamond	Pure Link	GeneJet	Nucleospin
вес материала (мг)	24,7 ±2,9	101 ±2	108 ±1	203
A260/280	1,4 ±0,06	1,7 ±0,03	1,8 ±0,04	1,9
A260/230	0,59 ±0,02	1,6 ±0,08	1,4 ±0,4	2,1
концентрация ДНК (нг/мкл)	39,3 ±1,8	12,3 ±1,5	37,5 ±13,8	34,6

Рис. 3. Электрофореграммы ДНК, выделенной из листьев лавандина: А – DiamondDNATM, Б – PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, В – GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit, Г – NucleoSpin® Plant II Midi kit; М — маркер, 1 — образцы ДНК из листьев растений, выращиваемых *ex situ*, 2 – образцы ДНК из листьев растений, культивируемых *in vitro*

С использованием автоматизированной системы для электрофореза был дополнительно проведен анализ ДНК, выделенной из листьев микропобегов, культивируемых *in vitro*. ДНК, полученная при помощи PureLink® Plant Total DNA Purification Kit и GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit, имела последовательности длиной 7266-60000 и 7030-60000 п. н. соответственно. Длина высокомолекулярной ДНК составляла 22529 п. н. и 33958 п. н. с концентрацией 0,527 нг/мкл и 4,77 нг/мкл.

Исследования анатомии листьев лавандина сорта Рабат показали накопление эфирных масел в тканях листа, что типично для данного типа растений. В качестве материала для получения ДНК использовали молодые листья лавандина, поскольку ювенильные органы содержат меньшие количества полисахаридов и других вторичных метаболитов. Например, при исследовании накопления фенольных соединений в растениях лавандина сорта Рабат *in vitro* установлено уменьшение искомых веществ в 1,9 раз ($668 \pm 19/100$ г) в сравнении с растениями *ex situ* (1305 ± 34 мг/100 г) [4]. Поскольку визуальная оценка срезов после гистохимического окрашивания позволила сделать выводы о меньшем накоплении включений с эфирным маслом в тканях листьев *in vitro*, предполагался более высокий качественный и количественный выход ДНК по сравнению с листьями растений *ex situ*. Наши данные показали, что использование молодых органов растений, в тканях которых присутствуют включения с эфирными маслами, не всегда позволяет достичь необходимых показателей чистоты ДНК при ее выделении, что связано, вероятнее всего, с компонентным составом буфера в наборе. В зависимости от производителя лизирующие/экстрагирующие буферы содержали СТАВ/ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) (NucleoSpin®) или SDS/ДЧН (додецилсульфат натрия) (Pure Link). СТАВ является неионогенным детергентом, способным осаждать НК и кислые полисахариды из растворов [8, 9]. Детергент образует стабильные, но растворимые комплексы при высоких концентрациях солей (0,7М NaCl). При низких концентрациях соли (4М NaCl) формирует комплекс СТАВ/НК в виде осадка, при этом большая часть полисахаридов остается в растворе [10, 11]. SDS в отличие от СТАВ осаждает белки и полисахариды как нерастворимый комплекс [12]. Спектрофотометрически чистота ДНК определяется при соотношении $A_{260/280}$, характеризующим отсутствие контаминации белками в диапазоне значений 1,8-2,0, и $A_{260/230}$, подтверждающим отсутствие полисахаридов и других вторичных метаболитов в диапазоне значений 2,0-2,2 [2, 8]. Допустимые пороговые значения для $A_{260/230}$ – 1,7, для $A_{260/230}$ – 1,8 [13].

Согласно нашим данным, наиболее эффективны те наборы для выделения ДНК из листьев лавандина, которые содержат СТАВ (NucleoSpin®), поскольку дают стабильный качественный и количественный выход ДНК, что подтверждено спектрофотометрическим анализом. Наборы GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit и PureLink® Plant Total DNA продемонстрирова-

ли удовлетворительные результаты по чистоте ДНК, поскольку в зависимости от типа культуры (*ex situ* или *in vitro*) при соотношении $A_{260/280}$ определяли пороговое значение 1,7, а для $A_{260/230}$ нижнее значение 1,8 не было достигнуто. При этом наибольший выход высокомолекулярной ДНК получали с GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit.

Выводы

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что для растений лавандина сорта Рабат предпочтительнее использовать коммерческие наборы, в состав которых входит СТАВ, что обеспечивает стабильный качественный выход ДНК.

Список использованной литературы

1. **Ghaffariyan S.**, Mohammadi S. A., Aharizad S. DNA isolation protocol for the medicinal plant lemon balm (*Melissa officinalis*, Lamiaceae) // Genet. Mol. Res., 2012. — V. 11. — P. 1049-1057.
2. **Vega-Vela N. E.**, Chacon-Sanchez M. I. Isolation of high-quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns // Agronomía Colombiana, 2011. — V. 23. — № 3. — P. 349-357.
3. **Sharma P.**, Joshi N., Sharma A. Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen // Indian Journal of Experimental Biology, 2010. — V. 48. — № 6. — P. 610-614.
4. **Митрофанова И. В.**, Палий А. Е., Гребенникова О. А., Браилко В. А., Лесникова-Седошенко Н. П., Работягов В. Д., Митрофанова О. В. Адаптационная способность перспективных сортов лаванды и лавандина при культивировании *in vitro* и *ex situ* // Сельскохозяйственная биология, 2018. — Т. 53. — Вып. 3. — С. 539-546.
5. **Паушева З. П.** Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
6. **Hammer O.**, Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontologia Electronica, 2001. — V. 4. — № 1. — 9 p.
7. **Работягов В. Д.**, Хохлов Ю. С., Палий А. Е. Морфобиологическая характеристика перспективных форм лавандина (*L. × intermedia* Emeric ex Loisel.) // Бюллетень ГНБС, 2017. — Вып. 123. — С. 83-89.
8. **Sambrook J.**, Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual, vol. 1. — NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001. — 2100 p.
9. **Tan S. C.**, Yip B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present // Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009. — V. 2009. — Article ID 574398, 10 p.
10. **Poms R. E.**, Glossl J., Foissy H. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat // European Food Research and Technology, 2001. — V. 213. — P. 361-365.
11. **Остроумов Л. А.**, Просеков А. Ю., Архипов А. Н., Мудрикова О. В. Метод выделения растительной ДНК из растений и продуктов питания на их основе // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2010. — Т. 12. — № 4(3). — С. 722-724.

12. **Рябушкина Н. А.**, Омашева М. Е., Галиакпаров Н. Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и практика, 2012. — № 2. — С. 9–26.
13. **Tiwari S.**, Tomar R. S., Tripathi M. K., Ahuja A. Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation // Indian Res. J. Genet. & Biotech., 2017. — V. 9. — № 4. — P. 478–485.

**¹ I. V. Bulavin, ¹ V. A. Brailko, ¹ O. A. Grebennikova, ¹ M. S. Andreev,
^{1,2} O. V. Krivenko, ¹ I. V. Mitrofanova**

¹Nikitsky Botanical Garden — National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Yalta, Crimea, Russia

²A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Crimea, Russia

EFFICIENCY EVALUATION OF COMMERCIAL KITS FOR DNA ISOLATION FROM LAVANDINE (*LAVANDULA* × *INTERMEDIA* EMERIC EX LOISEL.)