

УДК 577

Н.В.Пономарева (4 курс, каф. БФ), М.С.Вонский, к.б.н., ИНЦ РАН

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕСС МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Задача настоящей работы состояла в оптимизации метода выделения ДНК из растительного сырья (соевой муки) для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод должен обеспечивать максимально быстрое выделение ДНК, пригодной для ПЦР. Поскольку мишень для ПЦР, используемая в нашей работе, имеет в длину до 300 пар оснований, методы могут допускать фрагментацию выделяемой ДНК.

В работе были использованы следующие методики:

1. Метод СТАВ. Суть метода заключается в том, что СТАВ, связываясь с ДНК в растворе с высокой ионной силой, освобождает ДНК из ДНК - белковых комплексов. Осаждение ДНК проводят изопропанолом.
2. Сорбентный метод: ДНК освобождают из ДНК-белковых комплексов в растворе хаотропного агента и селективно сорбируют на микрочастицы кремния.
3. Метод СТАВ-2 отличается от метода СТАВ способом преципитации ДНК: при понижении ионной силы раствора комплекс СТАВ-ДНК выпадает в осадок.
4. Комбинация методов СТАВ-2 и сорбентного метода.

Качество выделенной ДНК оценивали следующими способами:

1. Метод электрофореза в 0,8% агарозном геле показывал присутствие нуклеиновых кислот (РНК и ДНК) в полученных фракциях.
2. Методом ПЦР с праймерами, специфичными к лектину сои, оценивали пригодность полученной ДНК для амплификации.
3. Спектрофотометрический метод. Соотношение A_{260}/A_{280} (поглощение при длинах волн 260 и 280 нм) показывает степень загрязнения полученных фракций ДНК белковыми примесями.

Полученные результаты показывают, что ДНК, выделенная из соевой муки всеми вышеперечисленными методами, является пригодной для последующей амплификации. Наиболее быстрыми методами являются СТАВ-метод и сорбентный метод. Максимально чистая фракция ДНК была получена при использовании метода 4. Фракции ДНК, полученные методами 1 и 3, содержат большее количество белковых примесей, и использование этих методов может привести к сохранению ингибиторов ПЦР при выделении ДНК из более сложного матрикса.