



УДК 577.2.08

## Сравнительная характеристика сорбционных способов выделения бактериальной и грибковой ДНК из пыльцы

Сыромятников М.Ю., Лопатин А.В., Кокина А.В.,  
Сальников А.В., Попов В.Н.

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Воронеж*

Поступила в редакцию 18.01.2016 г.

В настоящее время широкое распространение получили методы выделения ДНК и РНК, основанные на связывании нуклеиновых кислот с сорбирующими носителями. Их эффективность при выделении бактериальной, грибковой и растительной ДНК из пыльцы не оценена. Нами проведена сравнительная характеристика коммерческих наборов – «Проба-ГС», «Нуклеосорб, Комплектация "С"» и «Quick-gDNA™ MiniPrep», а также классического метода экстракции ДНК с помощью органических растворов – при выделении ДНК бактерий и грибов из пыльцы, собранной пчелами. Показано, что методы на основе сорбции нуклеиновых кислот полностью избавляют ДНК от примесей РНК. При этом наибольшие концентрации ДНК получены при использовании набора «Нуклеосорб. Комплектация С». При анализе относительной экспрессии генов бактерий, растений и грибов не было выявлено существенных отличий в эффективности выделения различными наборами.

**Ключевые слова:** пыльца, выделение ДНК, сорбция, эффективность метода, бактерии, грибы.

## Comparative characteristics of sorption methods of bacterial and fungal DNA isolation from pollen

Syromyatnikov M.Y., Lopatin A.V., Kokina A.V.,  
Salnikov A.V., Popov V.N.

*Voronezh State University, Voronezh*

DNA and RNA isolation methods, based on the binding of nucleic acids with sorbent media are widely used at present time. The efficiency of bacterial, fungal and plant DNA isolation method from pollen has not been studied. We have studied the effectiveness of commercial kits – «Proba-GS»; «Nukleosorb, Komplektacia "C"» and «Quick-gDNA™ MiniPrep», as well as of the traditional method of DNA extraction with organic solutions, on efficiency of bacterial and fungal DNA isolation from pollen collected by bees. It was shown that the methods based on the adsorption of nucleic acids completely eliminate contamination by RNA. The highest concentration of DNA was obtained using «Nukleosorb, Komplektacia "C"» kit. Analysis of the relative gene expression in bacteria, plants and fungi revealed no significant differences in the isolation efficiency by different methods.

**Keywords:** pollen, DNA extraction, sorption, the method effectiveness, bacteria, fungi.

### Введение

При выделении нуклеиновых кислот после разрушения клеточных стенок и лизиса мембран образуется мультикомпонентная смесь (раствор), содержащая, в том

числе, и ДНК. После этой стадии возможны 2 основных принципиальных классических подхода для очистки целевой ДНК: очистка путем органической экстракции [1] с последующим осаждением ДНК спиртами и растворением её в воде и ТЕ-буфере; дифференциальная сорбция ДНК на твердом носителе. В настоящее время широкое распространение получили методы выделения ДНК и РНК, основанные на связывании нуклеиновых кислот с сорбирующими носителями. Наборы для выделения ДНК широко коммерциализованы. В качестве сорбирующих выступают силикатные [2, 3, 4] и реже нитроцеллюлозные [5, 6] носители. Гель-хроматография практически не используется при изоляции нуклеиновых кислот, то время как для выделения аминокислот метод широко применим [7].

Пыльца является белковой пищей для медоносных пчел. Кроме того, пыльца, собранная пчелами, является биологически активной добавкой для человека. При этом в пыльце могут содержаться как бактериальные, так и грибковые организмы, которые могут продуцировать токсины опасные для человека [8]. Например, в пыльце могут находиться микроорганизмы патогенные для медоносных пчел – грибы рода *aspergillus sp.* [9].

Выделение и последующая идентификация патогенных микроорганизмов в пыльце возможна только при сорбционном выделении ДНК микроорганизмов из смеси пыльцевых зерен. В настоящее время методика выделения ДНК бактериальных и грибковых организмов из пыльцы не оптимизирована. Не был проведен анализ эффективности той или иной процедуры при выделении нуклеиновых кислот бактерий и грибов. Учитывая, что в настоящее время наиболее распространенным является изоляция ДНК на основе сорбирующих компонентов, целью нашей работы явилась оценка эффективности сорбционного выделения ДНК бактериальных и грибковых организмов коммерчески доступными наборами.

## Эксперимент

В качестве объекта исследования использовалась пыльца, собранная пчелами, со сроком годности не более полугода, имеющаяся в свободной продаже. Для выделения ДНК из пыльцы нами были апробированы 4 набора: 1. Коммерчески доступный набор Проба-ГС (ДНК-технологии, Россия). 2. Набор Нуклеосорб, Комплектация «С» (Праймтех, Белоруссия). 3. Набор Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research, США). В качестве альтернативы использования методов с сорбирующими компонентами нами использовался метод «ЦТАБ» (см. ниже).

Выделение ДНК с помощью коммерческих наборов Проба-ГС, Нуклеосорб, Комплектация «С» и Quick-gDNA™ MiniPrep проводилось согласно инструкции, приложенной к этим наборам, предварительно, 150 мг пыльцы растирали в стерильной ступке с 1 мл лизирующего раствора из соответствующего коммерческого набора, после чего центрифугировали 200 г 2 мин и отбирали супернатант для последующего выделения.

Выделение методом «ЦТАБ» проводилось по следующей процедуре:

1. 150 мг пыльцы растирали в стерильной ступке с 1 мл прогретого до 65°C, ЦТАБ-буфера (ЦТАБ 3%; 1,4М NaCl; 20 mM ЭДТА; 100 mM Tris; dH<sub>2</sub>O до необходимого объема);
2. Полученный гомогенат переносили в пробирку типа Eppendorf на 2 мл, инкубировали 5-7 мин при 65°C, периодически перемешивая;
3. Охлаждали пробирку до комнатной температуры, добавляли равный объем смеси хлороформ-изоамилового спирта (24/1) и перемешивали (3-5 мин);

4. Центрифугировали 5 мин при 13 000 г.
5. Супернатант переносили в чистую пробирку Eppendorf на 1.5 мл (не задевая среднюю и нижнюю фазы).
6. Добавляли 0.7 объёма холодного изопропанола.
7. Центрифугировали 5 мин при 21 000 г, отбирали супернатант.
8. Осадок дважды промывали этанолом по 5 мин.
9. Тщательно удаляли остатки спирта, подсушивали пробирки на воздухе 10-15 мин до полного высыхания осадка.
10. Осадок ДНК растворяли в mQ (дезонированная ультрачистая) H<sub>2</sub>O до полного его исчезновения.

Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с помощью спектрофотометра Hitachi U-2900. Измеряли поглощение препаратов тотальной ДНК при 260 нм, 280 нм и 320 нм. 260 нм – максимум поглощения азотистых оснований в составе нуклеотидов. О чистоте препарата судили по значению отношения A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. При расчете концентрации РНК учитывали значение поглощения при 320 нм, характеризующего степень белкового загрязнения.

Количественную полимеразную цепную реакцию проводили на приборе Bio-Rad CFX 96 (Bio-rad, США) с готовой коммерчески доступной смесью для PCR qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия) согласно следующему протоколу: первоначальный прогрев при 95°C – 2 минуты; 30 циклов вида: денатурация при 95°C в течение 30 секунд; отжиг праймеров при 55-63°C в течение 30 секунд; элонгация цепи при 72°C в течение 1 мин сек; инкубирование смеси при 72°C в течение 5 мин. Качество PCR продуктов оценивали по кривым плавления.

Аналитический электрофорез в агарозном геле проводили по следующей процедуре: в колбу наливали 98 мл дистиллированной воды и добавляли 2 мл 50X буфера (400мМ трис-ацетатный буфер, рН 8,5, с 50 мМ ЭДТА); взвешивали 2 г агарозы и помещали в колбу; доводили смесь до кипения на газовой горелке; после того, как смесь остыла до 70-60°C, вносили в расплавленный гель 5 мкл бромида этидия (0.1% спиртовой раствор; после застывания геля переносили его в электрофоретическую камеру; вносили в ячейки геля пробы, смешанные с краской для нанесения (2 мкл краски: 3 мкл проб) и проводили электрофорез при напряжении 7 В/см. Визуализацию результатов проводили на трансиллюминаторе TSP-20LM при длине волны 312 нм. Результаты фиксировали цифровой фотокамерой Casio.

## Обсуждение результатов

Диаграмма, отражающая количество ДНК, выделенной с помощью различных наборов, также ЦТАБ-методом, изображена на рис. 1. Далее оценивалась концентрация и чистота ДНК, которую оценивали по разности поглощения полученного препарата при 260 нм и при 280 нм. Во всех исследованных препаратах оптическая плотность при 260 нм была как минимум в два раза выше, чем при 280 нм, что говорит о том, что все препараты ДНК являются подходящими для проведения дальнейших исследований.

При оценке диаграммы на первый взгляд кажется, что наиболее эффективным является классический метод выделения на основе ЦТАБ. Однако это не так, т.к. с помощью классического метода выделения в конечном препарате мы имеем не только ДНК, но и РНК (мРНК, рРНК, тРНК), что сказывается на столь высоких показателях концентрации. Для подтверждения данного тезиса нами был сделан

электрофорез ДНК полученной разными способами. На рис. 2 изображена электрофореграмма выделенной ДНК.

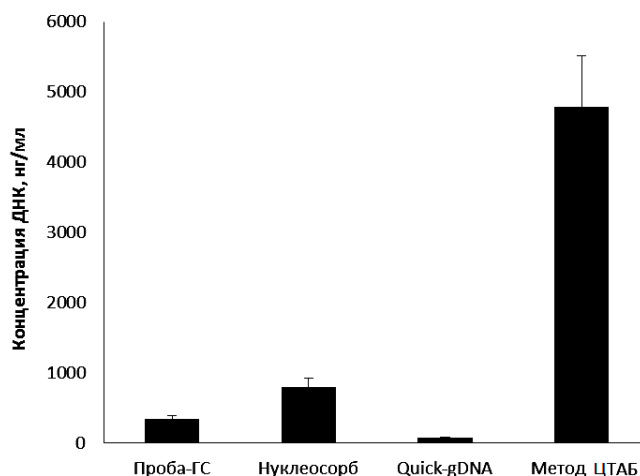


Рис. 1. Концентрации ДНК в зависимости от использования коммерческого набора, а также при использовании ЦТАБ метода.

Из представленной фореграммы следует, что наибольший выход чистой ДНК происходит при использовании коммерческого набора – Нуклеосорб. При выделении наборами Проба-ГС и Quick-gDNA не наблюдалось полосы на электрофорезе, что свидетельствует и низком выходе ДНК из пыльцы при использовании данных наборов.

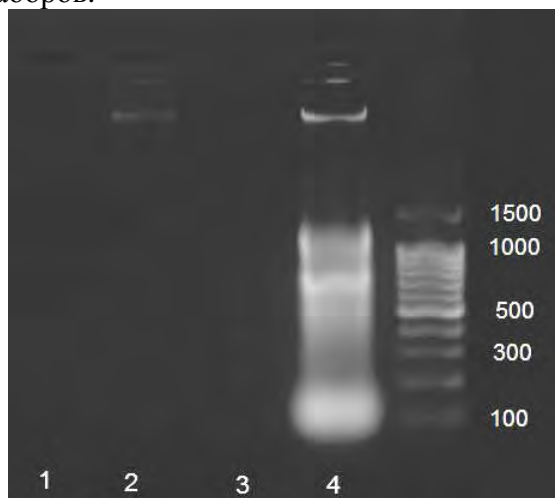


Рис. 2. Электрофореграмма выделенной ДНК с помощью различных коммерческих наборов. «Светящийся шлейф» у образца №4 является примесью РНК. 1 – Проба-ГС; 2 – Нуклеосорб; 3 - Quick-gDNA; 4 – Метод ЦТАБ.

Также, нами оценивался анализ профиля экспрессии «универсальных» генов для бактерий, грибов и растений. Суть этого методологического подхода заключается в оценке уровня относительной экспрессии этих генов при разных условиях выделения ДНК. Чем выше уровень их экспрессии, тем больше концентрация ДНК того организма, чей ген амплифицировался. В качестве такого гена чаще всего используют – митохондриальный ген субъединицы 1 цитохромоксидазы для животных [10], ядерный ген внутреннего транскрибирующего спейсера (ITS) для грибов [11], а также гены *gbcLb* и *matK* для растений [12]. Для бактерий используется ген 16S rRNA [13]. При анализе профиля

экспрессии универсальных генов для бактерий и грибов не было найдено существенных отличий между тестируемыми наборами (рис. 3.). Кроме того, ампликоны универсальных для растений генов, не были обнаружены. Это говорит о высокой степени деградации ДНК растений и/или о малом количестве нуклеиновых кислот растений в полученных препаратах ДНК.

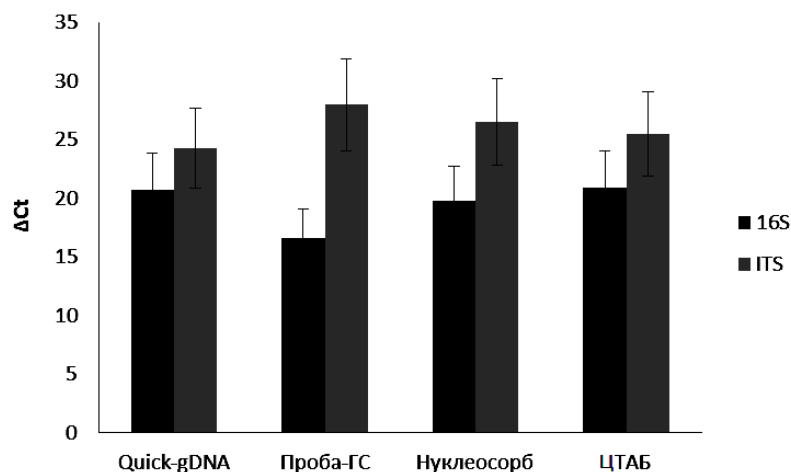


Рис. 3. Величина  $\Delta C_t$ , отражающая уровень экспрессии генов при выделении различными коммерческими наборами, а также СТАБ-методом.

Таким образом, несмотря на то, что выход ДНК у различных коммерческих наборов может варьировать, продукты ПЦР бактериальных и грибных организмов, в целом, «отжигаются» одинаково хорошо. Также был проведен электрофорез полученных продуктов ПЦР (рис. 4). Длины фрагментов ПЦР совпали с теоретически ожидаемыми во всех пробах (16 рРНК – около 500 п.н.; ITS – около 700 п.н.).

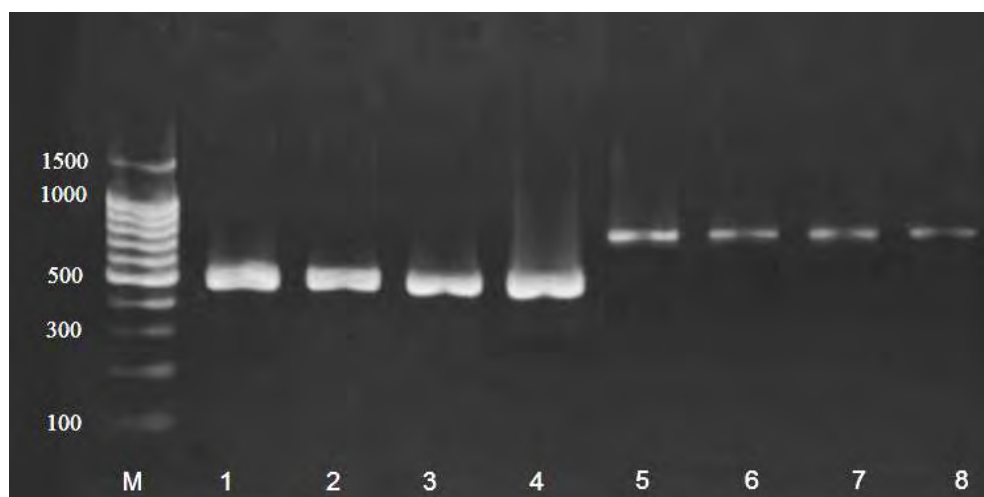


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР. 1 – Проба-ГС, 16S рРНК; 2 – Нуклеосорб, 16S рРНК; 3 - Quick-gDNA, 16S рРНК; 4 – Метод СТАБ, 16S рРНК; 5 – Проба-ГС, ITS; 6 – Нуклеосорб, ITS; 7 – Quick-gDNA, ITS; 8 – Метод ЦТАБ, ITS.

Однако, всё же это не является 100% показателем эффективности выделения бактериальной и грибковой ДНК. Необходимо учитывать как уровни экспрессии генов бактерий и грибов, так и концентрацию полученной ДНК.

## Заключение

Оценена эффективность выделения бактериальной и грибковой ДНК из пыльцы с помощью коммерческих наборов на основе сорбирующих компонентов, а также классическим методом органической экстракции. Показано, что методы на основе сорбции нуклеиновых кислот полностью избавляют ДНК от примесей РНК. При этом наибольшие концентрации ДНК получены при использовании набора «Нуклеосорб. Комплектация С». При анализе относительной экспрессии генов бактерий, растений и грибов не было выявлено существенных отличий в эффективности выделения различными наборами. Однако, учитывая стоимость наборов при молекулярно-генетическом анализе микробиологических свойств пыльцы наиболее целесообразно использовать наборы «Нуклеосорб. Комплектация С» и «Проба-ГС».

## Список литературы

1. Barnett R., Larson G.A. // *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 840, pp 13-19.
2. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A. // *Biosens Bioelectron.* 2003. Vol. 19, pp. 59-66.
3. Melzaka K.A., Sherwooda C.S., Turnerb R.F.B., Haynesc C.A. // *J. of Colloid and Interface Science.* 1996. Vol. 181. No 2. pp 635-644.
4. Poeckh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J. et al. // *Anal Biochem.* 2008. Vol. 373, pp. 253-262.
5. Kendall D., Lye G.J., Levy M.S. // *Biotechnol Bioeng.* 2002. Vol. 79. pp. 816-822.
6. Селеменев В.Ф., Рудаков О.Б., Славинская Г.В., Дроздева Н.В. М.: ДеЛи принт. 2008. 246 с.
7. Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F. // *Russian Journal of Physical Chemistry A.* 2001. Vol. 75, No 2, pp. 266-271.
8. González G., Hinojo M.J., Mateo R., Medina A. et al. // *Int. J. Food Microbiol.* 2005. Vol. 105, pp. 1-9.
9. Kacániová M., Fikselová M. // *Ann. Agric Environ Med.* 2007. Vol. 14, pp. 229-232.
10. Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R. // *Proc. Biol. Sci.* 2003. Vol. 270, pp. 96-99.
11. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, pp. 6241-6246.
12. Dong W., Cheng T., Li C., Xu C. et al. // *Mol. Ecol. Resour.* 2014. Vol. 14, No 2, pp. 336-343.
13. Sameer A., Barghouthi A // *Indian J. Microbiol.* 2011. Vol. 51, pp. 430-444.

## References

1. Barnett R., Larson G.A., *Methods Mol. Biol.*, 2012, Vol. 840, pp 13-19.
2. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A., *Biosens Bioelectron.*, 2003, Vol. 19, pp. 59-66.
3. Melzaka K.A., Sherwooda C.S., Turnerb R.F.B., Haynesc C.A., *J. of Colloid and Interface Science*, 1996, Vol. 181, No 2, pp 635-644.
4. Poeckh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J. et al. // *Anal Biochem.* 2008. Vol. 373, pp. 253-262.
5. Kendall D., Lye G.J., Levy M.S., *Biotechnol Bioeng.*, 2002, Vol. 79, pp. 816-822.
6. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaja G.V., Drozdeva N.V., M., DeLi print, 2008, 246 p.
7. Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F., *Russian Journal of Physical Chemistry A.* 2001, Vol. 75, No 2, pp. 266-271.
8. González G., Hinojo M.J., Mateo R., Medina A. et al., *Int. J. Food Microbiol*, 2005, Vol. 105, pp. 1-9.
9. Kacániová M., Fikselová M., *Ann. Agric Environ Med.*, 2007, Vol. 14, pp. 229-232.

10. Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R., *Proc. Biol. Sci.*, 2003, Vol. 270, pp. 96-99.
11. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, Vol. 109, pp. 6241-6246.
12. Dong W., Cheng T., Li C., Xu C. et al., *Mol. Ecol. Resour.*, 2014, Vol. 14, No 2, pp. 336-343.
13. Sameer A., Barghouthi A., *Indian J. Microbiol.*, 2011, Vol. 51, pp. 430-444.

**Сыромятников Михаил Юрьевич** -к.б.н., преподаватель кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, ВГУ, Воронеж, тел. +7 (473) 220-88-72

**Лопатин Алексей Васильевич** - к.б.н., вед.биолог биологического учебно-научного центра «Веневитиново», Воронеж

**Кокина Анастасия Васильевна** - магистрант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, ВГУ, Воронеж

**Сальников Алексей Владимирович** - к.б.н., инженер кафедры биохимии и физиологии клетки, ВГУ, Воронеж

**Попов Василий Николаевич** - д.б.н., заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии, ВГУ, Воронеж

**Syromyatnikov Mikhail Yu.** - Ph.D., teacher of the department of genetics, cytology and bioengineering, VSU, Voronezh, e-mail: [syromyatnikov@bio.vsu.ru](mailto:syromyatnikov@bio.vsu.ru)

**Lopatin Alexey V.** - PhD, a leading biologist of Biological teaching and research center "Venevitinovo", VSU, Voronezh, e-mail: [lopatin@bio.vsu.ru](mailto:lopatin@bio.vsu.ru)

**Kokina Anastasia V.** - graduate student of the department of genetics, cytology and bioengineering, VSU, Voronezh, e-mail: [nastenka.kokina@mail.ru](mailto:nastenka.kokina@mail.ru)

**Salnikov Alexey V.** - PhD, engineer of the department of biochemistry and cell physiology, VSU, Voronezh, e-mail: [biolog1987@rambler.ru](mailto:biolog1987@rambler.ru)

**Popov Vasilij N.** - Ph.D., head of the department of genetics, cytology and bioengineering, VSU, Voronezh, e-mail: [pvn@bio.vsu.ru](mailto:pvn@bio.vsu.ru)