

УДК 613.26:577.213.32

Руководитель научного образовательного центра Л.С. Дышлюк,
старший преподаватель Ю.В. Голубцова,
аспирант М.В. Новоселова, аспирант К.А. Шевякова
(Кемер. техн. ин-т пищ. пром-ти) кафедра бионанотехнология. тел. (3842) 39-05-37
E-mail: ksenija-shevjakova@rambler.ru

Head of research and educational center L.S. Dyshlyuk,
Senior Lecturer Y.V. Golubtsova,
graduate student M.V. Novoselov,
graduate student K.A. Shevyakova
(Kemerovo Institute of Food Science and Technology) Department of bionanotechnology
phone (3842) 39-05-37
E-mail: ksenija-shevjakova@rambler.ru

Исследование методов экстракции ДНК из объектов растительного происхождения и продуктов питания на их основе

Investigation of methods of DNA extraction from plant origin objects and foods based on them

Реферат. За последние десятилетия в мире разработаны современные высокоэффективные методы определения качества и безопасности пищевой продукции, основанные на применении последних научных достижений. Особое место занимают методы, опирающиеся на достижения молекулярной биологии и генетики. На современном этапе развития в области оценки качества продовольственного сырья и пищевых продуктов наибольшее значение приобретают высокоточные, чувствительные и специфичные методы исследований, среди которых, лидирующее место занимает метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. Ключевым моментом в подготовке материала для проведения ПЦР является выделение нуклеиновых кислот. Низкое содержание ДНК в растительном материале и высокая концентрация вторичных метаболитов затрудняют процесс ее экстракции. Ключевым решением этой проблемы является подбор высокоэффективной методики экстракции, позволяющей получить ДНК надлежащего качества и чистоты. В исследовании проведен сравнительный анализ методов выделения нуклеиновых кислот из плодово-ягодного сырья и продуктов на его основе. Общий анализ экспериментальных данных позволил определить наиболее эффективный способ экстракции ДНК. В ходе сравнительного анализа установлено, что для экстракции ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов, приготовленных на его основе наиболее пригоден набор реагентов «Сорб-ГМО-А». Описанный подход дает возможность получить дезоксирибонуклеиновую кислоту надлежащего качества и чистоты.

Summary. For the last decades modern and highly efficient methods of determining the quality and safety of food products, based on the application of the latest scientific achievements were developed in the world. A special place is given to the methods based on achievements of molecular biology and genetics. At the present stage of development in the field of assessing the quality of raw materials and processed food products much attention is given to highly accurate, sensitive and specific research methods, the method of polymerase chain reaction (PCR) occupying a leading place among them. PCR is a sophisticated method that simulates the natural DNA replication and allows to detect a single specific DNA molecule in the presence of millions of other molecules. The key point in the preparation of material for PCR is the extraction of nucleic acids. The low content of DNA in plant material and the high concentration of secondary metabolites complicate the process of extraction. The key solution to this problem is highly effective method of extraction, which allows to obtain the DNA of adequate quality and purity. Comparative analysis of methods for the extraction of nucleic acids from fruit raw materials and products based on them was carried out in the study. General analysis of the experimental data allowed us to determine the most efficient method for DNA extracting. In the comparative analysis it was found out that to extract DNA from plant raw materials and food products prepared on their basis it is the most suitable to use "Sorb-GMO-A" reactants kit (set). The approach described gives us a brilliant opportunity to obtain deoxyribonucleic acid proper quality and purity.

Ключевые слова: плодово-ягодное сырье, методика, ДНК, полимеразная цепная реакция, выделение.

Keywords: fruit and berry raw materials, method, DNA, polymerase chain reaction, extraction.

В настоящее время разработка и внедрение качественно новых, безопасных пищевых продуктов, максимальное использование биологических свойств сырья и компонентов, способствующих сохранению здоровья, является важнейшим направлением государственной политики в области здорового питания. Обеспечение населения качественным продоволь-

ствием имеет актуальное значение, поскольку напрямую или косвенно оказывает влияние на демографические, социальные, политические изменения, происходящие в государстве, а также обеспечивает стабильность и безопасность государства во взаимозависимом мире. [3].

© Дышлюк Л.С., Голубцова Ю.В.,
Новоселова М.В., Шевякова К.А., 2014

Анализ качества продуктов питания является непростой задачей. Главная причина затруднений – их многокомпонентность и индивидуальность [8].

Сравнительно недавно основное значение в оценке качества пищевых продуктов придавали сенсорным методам, основанным на анализе ощущений органов чувств человека [6]. За последние десятилетия в мире разработаны современные высокоэффективные методы определения качества и безопасности пищевой продукции, основанные на применении последних научных достижений. Особое место занимают методы, опирающиеся на достижения молекулярной биологии и генетики [4].

Одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии стало открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Это позволило поднять контроль качества и безопасности плодово-ягодного сырья и пищевых продуктов на его основе на новый уровень [7]. ПЦР – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. К основным достоинствам данного метода анализа относят: специфичность; универсальность (может применяться практически любые материалы); высокая чувствительность (возможно выявлять единичные копии ДНК); малый объем биологического материала (проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы (до нескольких микролитров); высокая скорость получения результата анализа [2].

ПЦР-анализ состоит из трех основных процедур: подготовка пробы исследуемого материала, которая в большинстве случаев сводится к изоляции ДНК и ее очистке; амплификация (собственно ПЦР) и детекция продуктов амплификации [7].

Выделение и очистка нуклеиновых кислот – это первый шаг в большинстве молекулярно-биологических исследований ДНК, в том числе и полимеразной цепной реакции. В основе выделения нуклеиновых кислот лежат как физические, так и химические процессы. При экстракции ДНК из растительных объектов необходимо не только дезактивировать клеточные ферменты, но и «удалить» запасные

вещества, например, полисахариды и вторичные метаболиты, такие как алкалоиды, фенольные соединения, терпены, которые не просто мешают изолированию ДНК, но и отрицательно влияют на ее качество. Качество и чистота нуклеиновых кислот относятся к наиболее важным факторам ПЦР анализа. Для того чтобы получить высокоочищенные нуклеиновые кислоты, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения [1].

Целью настоящего исследования являлось выявление эффективного метода выделения ДНК из объектов растительного происхождения и продуктов питания на их основе.

В качестве объектов исследования использовались ДНК фруктов и ягод: малины, земляники, крыжовника, шиповника, вишни/черешни, банана, киви, а также пищевые продукты, самостоятельно изготовленные на их основе.

Исследуемые образцы пищевых продуктов или их компоненты готовили для извлечения из них ДНК, удаления примесей, которые могут ингибировать ПЦР. Для этого измельчение проводили с помощью стерильного скальпеля, ножниц и одноразового шпателя и гомогенизировали в керамической ступке.

Степень чистоты выделенных нуклеиновых кислот определяли с помощью спектрофотометрического метода анализа, основанного на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной области спектра.

Извлечение ДНК проводили тремя разными методами:

1. Фенольной экстракцией, которая рекомендуется для быстрого выделения небольших количеств геномной ДНК растений.

2. С применением коммерческого набора «ПРОБА–ЦТАБ» - комплект реагентов для выделения растительной ДНК (ООО «НПО ДНК–Технология», Москва).

3. С применением коммерческого набора «Сорб-ГМО-А» (ЗАО «Синтол», Москва).

В ходе исследования все рассмотренные методы позволили выделить ДНК из исследуемых образцов, независимо от используемого объекта. В таблице 1 представлена сравнительная характеристика методик выделения ДНК из плодово-ягодного сырья.

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика методик выделения ДНК из плодово-ягодного сырья

Параметры сравнения	Методика		
	с дополнительной экстракцией фенолом	«ПРОБА–ЦТАБ»	«Сорб-ГМО-А»
1	2	3	4
Масса навески, мг	100-150	100-150	100-150
Время проведения выделения, час	2,50 ± 0,02	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
Очистка ДНК	растворители	сорбент	сорбент

1	2	3	4
Температура инкубации, °С	65,00 ± 0,39	65,00 ± 0,39	60,00 ± 0,36
Время перемешивания вручную, мин	19,00 ± 0,11	-	-
Время центрифугирования за весь период выделения, мин	23,00 ± 0,14	16,00 ± 0,09	9,50 ± 0,06
Условия хранения пробы	+ 20,00 ± 0,12 °С 12 часов	- 20,00 ± 0,12 °С 6 месяцев	- 20,00 ± 0,12 °С 6 месяцев

Во всех трех методах выделения ДНК масса навески различалась незначительно. В первых двух методах с дополнительной экстракцией фенолом и применением коммерческого набора «ПРОБА-ЦТАБ» температура инкубации составила $65 \pm 0,39$ °С, что на 5 °С выше, чем в третьем случае с применением коммерческого набора «Сорб-ГМО-А» (температура инкубации $60,00 \pm 0,36$ °С). После лизиса образцы центрифугировали. Время центрифугирования в случае применения набора «Сорб-ГМО-А» составило $9,50 \pm 0,06$ мин, что в два раза меньше чем в методах с применением фенола и набора «ПРОБА-ЦТАБ», время центрифугирования которых $23,00 \pm 0,14$ мин и $16,00 \pm 0,09$ мин соответственно. Скорость центрифугирования на этапах выделения ДНК в случае с дополнительной экстракцией с фенолом составила 12 тыс. об/мин, в методе с применением набора

«ПРОБА-ЦТАБ» – 13 тыс. об/мин, с набором «Сорб-ГМО-А» – 7 тыс. об/мин.

Таким образом, нуклеиновые кислоты, выделенные методом с применением набора «Сорб-ГМО-А» будут подвергаться меньшему термическому и механическому воздействию.

В методе фенольной экстракции для выделения ДНК на стадии отмывания и преципитации использовали химический способ – растворители. Во втором и третьем случае с применением наборов «ПРОБА-ЦТАБ» и «Сорб-ГМО-А» использовали сорбент в виде эмульсии.

В таблице 2 представлена сравнительная характеристика чистоты выделенной ДНК. Степень чистоты выделения дезоксирибонуклеиновых кислот определяли высокочувствительным, простым в исполнении спектрофотометрическим методом, основанном на поглощении монохроматического потока световой энергии при прохождении его через исследуемый раствор [6].

Таблица 2

Сравнительная характеристика чистоты выделенной ДНК

Метод выделения ДНК	Объект исследования	Чистота ДНК при A260/280	Концентрация выделенной ДНК, мг/г
1	2	3	4
с дополнительной экстракцией фенолом	Смесь 0,1% земляники и банана	1,78	0,38
	Смесь 0,1% малины и киви	1,79	0,36
	Смесь 0,1% вишни и малины	1,78	0,36
	Смесь 0,1% шиповника и вишни	1,79	0,38
	Смесь 0,1% крыжовника и киви	1,80	0,36
	Смесь 0,1% малины и шиповника	1,78	0,36
«ПРОБА- ЦТАБ»	Смесь 0,1% земляники и банана	1,94	0,41
	Смесь 0,1% малины и киви	1,97	0,39
	Смесь 0,1% вишни и малины	2,01	0,39
	Смесь 0,1% шиповника и вишни	1,99	0,38
	Смесь 0,1% крыжовника и киви	2,03	0,40
	Смесь 0,1% малины и шиповника	1,99	0,42
«Сорб-ГМО-А»	Смесь 0,1% земляники и банана	1,97	0,42
	Смесь 0,1% малины и киви	1,99	0,42
	Смесь 0,1% вишни и малины	1,94	0,43
	Смесь 0,1% шиповника и вишни	1,97	0,43
	Смесь 0,1% крыжовника и киви	2,02	0,44
	Смесь 0,1% малины и шиповника	2,00	0,43
с дополнительной экстракцией фенолом	Повидло малиновое, 100%	1,77	0,35
	Повидло земляничное, 100%	1,76	0,36
	Повидло из крыжовника, 100%	1,76	0,35
	Повидло вишневое, 100%	1,76	0,35
	Повидло банановое, 100%	1,76	0,35
	Повидло из киви, 100%	1,76	0,35
	Повидло из шиповника, 100%	1,76	0,36
«ПРОБА- ЦТАБ»	Повидло малиновое, 100%	1,98	0,39
	Повидло земляничное, 100%	1,99	0,39

1	2	3	4
	Повидло из крыжовника, 100%	1,98	0,40
	Повидло вишневое, 100%	1,98	0,38
	Повидло банановое, 100%	2,01	0,39
	Повидло из киви, 100%	1,98	0,38
	Повидло из шиповника, 100%	2,00	0,39
«Сорб-ГМО-А»	Повидло малиновое, 100%	1,97	0,43
	Повидло земляничное, 100%	1,98	0,45
	Повидло из крыжовника, 100%	1,97	0,44
	Повидло вишневое, 100%	1,95	0,42
	Повидло банановое, 100%	1,94	0,43
	Повидло из киви, 100%	1,97	0,44
	Повидло из шиповника, 100%	1,97	0,43

Анализ экспериментальных данных, представленных в таблице 2, указывает на то, что чистота ДНК при $A_{260/280}$ нм всех категорий фруктово-ягодных смесей при выделении ДНК первым методом с дополнительной экстракцией фенолом составляет от 1,76 до 1,80; вторым и третьим с применением наборов «ПРОБА-ЦТАБ» и «Сорб-ГМО-А» - от 1,94 до 2,03. При этом концентрация выделенной ДНК составляет при экстракции первым методом от 0,35 до 0,38 мг/г продукта, вторым – от 0,38 до 0,42 мг/г продукта, третьим – от 0,42 до 0,45 мг/г.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования выбранных методик выделения нуклеиновых кис-

лот из плодово-ягодных объектов. Общий анализ экспериментальных данных позволил определить наиболее эффективный способ экстракции ДНК. В ходе сравнительного анализа установлено, что для экстракции ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов, приготовленных на его основе, наиболее пригоден набор реагентов «Сорб-ГМО-А». Описанный подход дает возможность получить дезоксирибонуклеиновую кислоту надлежащего качества и чистоты.

Проведенные исследования представляют значительный научный и практический интерес при оценке качества продовольственного сырья и продуктов питания методом полимеразной цепной реакцией.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.
- 2 Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции. М., 2012. 78 с.
- 3 Расолько Л.А. Качество как фактор предпочтений потребителя // Молочный продукт: специализированный информационно-аналитический журнал. 2008. № 2. С. 26
- 4 Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: Бином, 2009. 256 с.
- 5 Никитина Е.В., Решетник О.А. Безопасность пищевых продуктов. Казань, 2006. 92 с.
- 6 Просяков А.Ю., Бабич О.О., Сухих С.А. Современные методы исследования сырья и биотехнологической продукции. Кемерово, 2013. 183 с.
- 7 Просяков А.Ю., Бабич О.О. Генная инженерия: учебное пособие. М.: Достижения науки и техники АПК, 2010. 216 с.
- 8 Шаулина Л. П., Корсун Л.Н. Контроль качества и безопасности пищевых продуктов и продовольственного сырья. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2011. 111 с.

REFERENCES

- 1 Glik B., Pasternak D. Molekuliarnaia biotekhnologiya. Printsipy i primeneniye [Molecular biotechnology Principles and application]. Moscow, Mir, 2002. 589 p. (In Russ.).
- 2 Zorina V.V. Osnovy polimeraznoi tsepoi reaktsii [The basic of polymerase chain reaction]. Moscow, Mir, 2012. 78 p. (In Russ.).
- 3 Rasol'ko L. A. Quality as the factor of consumer preferences. *Molochnyi product*. [Dairy product], 2008, no. 2, pp. 26 (In Russ.).
- 4 Lukashov V.V. Molekuliarnaia evoliutsiia i filogeneticheskii analiz [Molecular evolution and phylogenetic analysis]. Moscow, Binom, 2009. 92 p. (In Russ.).
- 5 Nikitina E.V., Reshetnik O.A. Bezopasnost' pishchevykh produktov [Food safety]. Kazan', 2006. 92 p. (In Russ.).
- 6 Prosekov A.Iu., Babich O.O., Sukhikh S.A. Sovremennye metody issledovaniia syria i biotekhnologicheskoi produktsii [Modern methods of research of raw materials and biotechnology products]. Kemerovo, 2013. 183 p. (In Russ.).
- 7 Prosekov A.Iu., Babich O.O. Gennaia inzheneriia [Genetic engineering]. Moscow, Dostizheniia nauki i tekhniki APK, 2010. 216 p. (In Russ.).
- 8 Shaulina L.P., Korsun L.N. Kontrol' kachestva i bezopasnosti pishchevykh produktov i prodovol'stvennogo syr'ia [Quality control and safety of food products and raw materials]. Irkutsk, Izd-vo IGU, 2011. 111 p. (In Russ.).