

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОКОЛОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

Дегтяр И.В.¹, Лантушенко А.О.^{1, 2}, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: skuratovskaya95@mail.ru

² ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию: 04.08.2020

Аннотация. В статье рассмотрены методики выделения ДНК из цианобактерии *Arthrospira platensis*. Для контроля чистоты и целостности исследуемой культуры использовался микроскопический и спектрофотометрический анализ. Эксперимент по выделению ДНК проводился по четырём различным протоколам: два с использованием колонок, кислотнo-щелочной и с помощью набора «ДНК-экстран». Контроль чистоты выделенной ДНК и определение ее концентрации определялось с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer N60. Наибольшая концентрация выделенной ДНК была получена с использованием кислотнo-щелочного метода, при этом наиболее чистые препараты были выделены набором «ДНК-экстран» и на колонках «К-СОРБ».

Ключевые слова: *Arthrospira platensis*, выделение ДНК, спектрофотометрия

Цианобактерии (сине-зелёные водоросли) *Arthrospira platensis* являются ценным источником биологически активных веществ. Биомасса данных цианобактерий содержит около 70% белка и полный набор необходимых аминокислот, примерно 11% липидов, содержащих γ -линоленовую кислоту, около 20% углеводов, а также широкий спектр важнейших микроэлементов и витаминов нужных для жизни человека [1, 2]. Спирулина обладает иммуномодулирующим, иммуностимулирующим и антиоксидантным действием и может корригировать изменение метаболизма, которые возникают из-за неблагоприятных внешних факторов [3]. Вышеперечисленные свойства обусловлены наличием в *Arthrospira platensis* следующих компонентов: с-фикоцианин, аллофикоцианин, β -каротин, хлорофилл a и др. [4].

В молекулярно-биологических исследованиях процедура выделения ДНК является рутинным методом фундаментального и прикладного характера. На сегодняшний день уровень молекулярно-генетических подходов (секвенирование, генотипирование и т.д.) даёт возможность анализировать большое количество организмов с целью обнаружения молекулярной фенотипической изменчивости, полиморфизма, дифференциальной экспрессии генов, устойчивости к стрессовым факторам внешней среды и др.

Исходя из цели работы, в зависимости от объекта исследования используются различные методики выделения ДНК [5,6]. Таких подходов существует несколько [7], а также доступно большое количество реактивов. Важным этапом для большинства работ и предметом для изучения является организация процесса выделения ДНК. Существует множество стандартных протоколов для выделения ДНК из разных объектов исследования, в частности, тканей растений [8], насекомых [9] и человеческой плазмы крови [10].

В данном исследовании был проведен сравнительный анализ четырех различных протоколов выделения ДНК из *Arthrospira platensis*, подобраны оптимальные условия для проведения процедуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Предварительно чистоту и целостность живой культуры *Arthrospira platensis* предварительно оценивали микроскопически с помощью оптического микроскопа МИКМЕД-6 (увеличение 400x и 1000x), также были сняты спектры поглощения культуры на спектрофотометре Unicо 2800.

Клеточную суспензию живой культуры *Arthrospira platensis* распределили в 12 центрифужных пробирок. Клетки отделяли от культуральной жидкости при помощи центрифугирования в течение 5 минут при 5000 об/мин. Объем образца в каждой из 12 пробирок после осаждения составил примерно 0,5 мл.

Эксперимент проводился по четырём протоколам выделения ДНК.

1. Методика выделения ДНК на основе протокола с использованием щелочи и кислоты. В полученные 3 образца клеток цианобактерий добавляли 150 мкл реагента щелочного лизиса и полученный раствор отправляли нагреваться до 95°C в течение 5-30 минут. Далее полученную смесь нейтрализовали добавлением 150 мкл кислотного раствора Tris HCl.

2. Методика выделения ДНК на основе протокола Analytik Jena на колонках. По данному протоколу на первом этапе добавляли в 3 пробирки 400 мкл лизирующего раствора и 10 мкл протеиназы. Полученный раствор перемешивали на вортексе. Далее пробирки отправляли в термошейкер и оставляли на 60 минут при 60°C. После охлаждения до комнатной температуры содержимое пробирок центрифугировалось на 11000 об/мин в течение 1 минуты, далее в чистые пробирки переносили надосадочную жидкость. Далее добавляли 400 мкл осаждающего раствора и содержимое пробирки перемешивали на вортексе. Полученный объём переносили на колонку. Центрифугировали в течение 2 минут при 11000 об/мин. Удаляли жидкость из коллектора. На колонку наносили 500 мкл промывочного раствора и центрифугировали на 11000 об/мин 1 мин, удаляли жидкость. Наносили ещё

раз 750 мкл второго промывочного раствора. Повторили центрифугирование и удалили жидкость из коллектора. После этого колонки возвращали обратно в пустые коллекторы и центрифугировали ещё 3 минуты на 11000 об/мин для того, чтобы удалить все следы этанола. Колонки помещали в чистые пробирки и добавляли 200 мкл элюирующего раствора. Смесь инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре и центрифугировали при 11000 об/мин 1 минуту.

3. Методика выделения ДНК на основе протокола набора «ДНК-Экстран» для растений. В 3 пробирки с клетками цианобактерии добавляется 20 мкл лизирующего раствора и с помощью тefлонового пестика производится растирание клеток. Далее добавляли ещё 280 мкл лизирующего раствора и перемешивали. В пробирки помещали по 3 мкл раствора РНКазы и полученный раствор перемешивали на вортексе. Данную смесь инкубировали в течение 1 часа при температуре 60°C. Для осаждения белков к лизату добавляется 100 мкл осаждающего раствора и при помощи центрифуги на 13000 об/мин в течение 5 минут образуются плотный осадок. Супернатант переносится в чистые пробирки и добавляется осаждающий раствор 300 мкл. Смесь перемешивали переворачиванием до появления видимого осадка ДНК. Далее центрифугировали на 13000 об/мин в течение 5 минут. Затем необходимо осторожно слить супернатант и промокнуть пробирки фильтровальной бумагой. Подсушивали пробирки в термостате 10 минут при 37°C до полного испарения спирта. В пробирку добавляли 400 мкл промывочного раствора и перемешивали. Центрифугировали в течение 2 минут на 13000 об/мин. Удаляли супернатант и пробирки промакивали фильтровальной бумагой. Открытые пробирки подсушивали до полного испарения спирта. К осадку добавляли 30 мкл элюирующего раствора, перемешивали и подогревали при 65°C 5 минут до растворения ДНК.

4. Методика выделения ДНК протоколом на колонках «К-СОРБ». В 3 пробирки с клетками спирулины добавили 10 мкл протеиназы К и 200 мкл лизирующего раствора. Содержимое пробирки перемешивали на вортексе и полученную смесь инкубировали при температуре 65°C в течение 15 минут. Далее добавляли 200 мкл осаждающего раствора и содержимое пробирки перемешивали на вортексе. Полученный объём переносили на колонку. Центрифугировали в течение 1 минуты при 8000 об/мин, а затем удаляли жидкость из коллектора. На колонку наносили 400 мкл промывочного раствора и центрифугировали на 8000 об/мин 1 мин и удаляли жидкость. Далее добавляли ещё раз 400 мкл второго промывочного раствора и повторяли центрифугирование, а затем ещё 200 мкл этого раствора и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 2 минут. Колонки переносили в чистые пробирки и добавляли 50 мкл элюирующего раствора. Смесь инкубировали в течение 2 минут и центрифугировали при 8000 об/мин 1 минуту.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 представлены фотографии *Arthrospira platensis*, которые были сделаны на тринокулярном микроскопе МИКМЕД-6 с увеличением 400х и 1000х. Микроскопический анализ свидетельствует о чистоте и целостности исследуемой культуры, о высоком качестве исходных образцов.

Спектры поглощения клеточной культуры, полученные с помощью спектрофотометра Unico 2800, представлены на рисунке 2.

Используя спектрофотометр NanoPhotometer N60 (Implen, Германия), измеряли поглощение ультрафиолетового света в образцах ДНК в диапазоне 200...400 нм. В качестве референса (контроля) использовались элюирующие растворы каждого протокола. Были получены концентрации ДНК (нг/мкл), а также отношения поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (A_{260}/A_{280}) и 260 нм и 230 нм (A_{260}/A_{230}). Коэффициент A_{260}/A_{280} отражает чистоту образца от белков, фенола и других веществ, поглощающих свет на 280 нм, где нормой считается значение порядка 1,8. Второй коэффициент A_{260}/A_{230} отражает чистоту образца от фенолята ионов, тиоцианатов и других органических соединений, норма около 2. Результаты представлены в таблице 1.

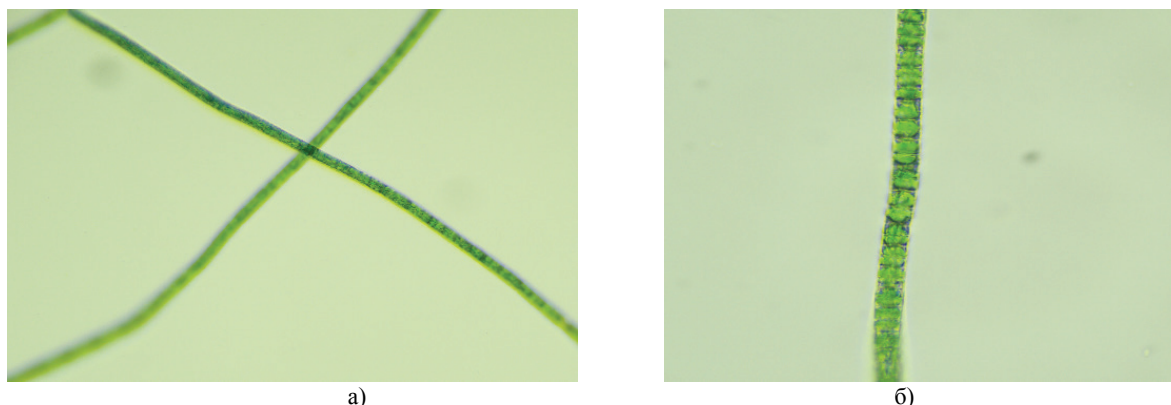


Рисунок 1. Фотографии *Arthrospira platensis*: а) увеличение 400х, б) увеличение 1000х

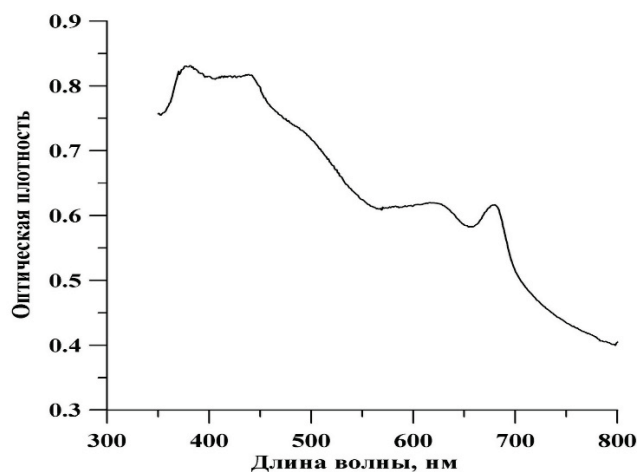


Рисунок 2. Спектр поглощения *Arthrospira platensis*

Из таблицы 1 видно, что наибольшая концентрация выделенной ДНК получается при использовании кислотно-щелочного протокола.

На рисунке 2 представлены спектры поглощения ДНК, выделенной различными видами протоколов.

Спектры поглощения свидетельствуют о том, что использование кислотно-щелочного протокола дает сильно загрязненный образец с высоким содержанием примесей, а применение протоколов «ДНК-экстран» и «К-СОРБ» дает более чистый раствор ДНК, при этом использование протокола «К-СОРБ» позволяет получить концентрацию ДНК, примерно в 5 раз превышающую в протоколе «ДНК-экстран». Далее был проведен гель - электрофорез полученных фрагментов ДНК в агарозном геле. Во всех четырех образцах доминировала фракция

Таблица 1. Концентрации и коэффициенты A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} ДНК, выделенной из *Arthrospira platensis* с помощью различных протоколов

| № образца | Соотношение коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280} | Соотношение коэффициентов поглощения A_{260}/A_{230} | Концентрация, нг/мкл |
|--|--|--|----------------------|
| Метод на основе щелочно-кислотного протокола | | | |
| 1 sample | 1,986 | 0,344 | 65,75 |
| 2 sample | 1,976 | 0,320 | 73,70 |
| 3 sample | 1,964 | 0,371 | 68,55 |
| Метод на основе протокола Analytik jena | | | |
| 1 sample | 2,154 | 0,085 | 44,8 |
| 2 sample | 2,182 | 0,564 | 57,6 |
| 3 sample | 2,909 | 0,028 | 19,2 |
| Метод на основе протокола набора «ДНК-Экстран» | | | |
| 1 sample | 2,136 | 0,910 | 7,05 |
| 2 sample | 2,069 | 0,764 | 6,00 |
| 3 sample | 2,095 | 0,557 | 4,40 |
| Метод на основе протокола на колонках «К-СОРБ» | | | |
| 1 sample | 2,160 | 2,798 | 37,40 |
| 2 sample | 2,182 | 3,283 | 30,05 |
| 3 sample | 2,169 | 2,977 | 31,15 |

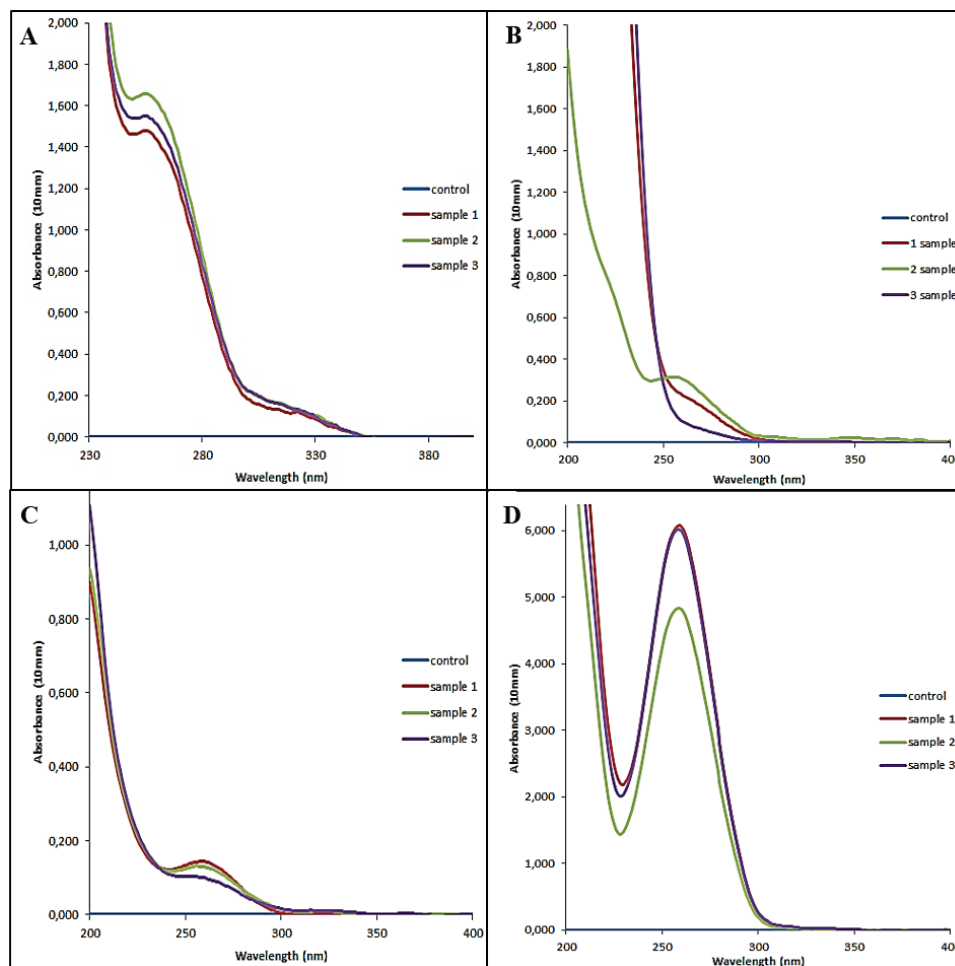


Рисунок 3. Спектры поглощения ДНК *Arthrospira platensis*: А) на основе щелочно-кислотного протокола, В) на основе протокола Analytik jena, С) на основе протокола набора «ДНК-Экстран», D) на основе протокола на колонках «К-СОРБ»

относительно коротких фрагментов, при этом в электрофореграммах «ДНК-экстран» и кислотно-щелочного протокола также определялись полосы более длинных фрагментов. Таким образом, целесообразность использования протокола определяется дальнейшими целями исследования: для ПЦР-анализа можно использовать самый дешевый кислотно-щелочной протокол, дающий самую высокую концентрацию ДНК. Для дальнейшего секвенирования, предъявляющего высокие требования к чистоте выделенной ДНК, целесообразно применять протокол на колонках «К-СОРБ» или набор «ДНК-экстран».

Работа была выполнена в рамках госзадания № FEFM-2020-0003.

Список литературы / References:

1. Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.*, 1983, vol. 47, pp. 551-558.
2. Reed R.H., Warr S.R.C., Richardson D.L., Moore D.J., Stewart W.D.P. Bluegreen algae (cyanobacteria): prospects and perspectives. *Plan. and Soil*, 1985, vol. 89, pp. 97-106.
3. Khan Z., Bhadouria P., Bisen P.S. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr. Pharm. Biotechnology*, 2005, vol. 5, pp. 373-379.
4. Brown I.I., Karakis S.G., Filippova T.O., Sarkisova S.A., Levitskiy A.P. The physiological effects of phycocyanin crude extract obtained from the G-27 overproducing strain of *Spirulina platensis*. *2nd European Workshop. Biotechnology of microalgae*, 1995, pp. 70-73.
5. Harwood A.J. Basic DNA and RNA Protocols, *Methods in Molecular Biology. New Jersey: Humana Press Totowa*, 1994, vol. 58, pp. 3-7.
6. Moss D., Harbison S.A., Saul D.J. An Easily Automated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Procedure Using a Thermostable Proteinase. *Int. J. Legal Med*, 2003, vol. 117, pp. 340-349.
7. Milligan B.G. Total DNA isolation. *Oxford University Press*, 1998, pp. 29-64.
8. Lutz K., Wenqin W., Zdepski A., Michael T. Isolation and analysis of high-quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. *BMC Biotechnol.*, 2011, vol. 11, p. 54.
9. Hong Chen, Murugesan Rangasamy, Sek Yee Tan, Haichuan Wang, B. D. Siegfried. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS One*, 2010, vol. 5(8).

10. Bravo D., Clari M., Costa E., Muñoz-Cobo B., Solano C., Remigia M.J., Navarro D. Comparative Evaluation of Three Automated Systems for DNA Extraction in Conjunction with Three Commercially Available Real-Time PCR Assays for Quantitation of Plasma Cytomegalovirus DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49 (8), pp. 2899-2904.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT PROTOCOLS FOR DNA EXTRACTION FROM ARTHROSPIRA PLATENSIS

Degtyar I.V.¹, Lantushenko A.O.¹, Lelekov A.S.²

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: skuratovskaya95@mail.ru

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

Abstract. The article discusses the methods for DNA extraction from cyanobacteria *Arthrospira platensis*. Microscopic and spectrophotometric analysis was used to control the purity and integrity of the culture under study. The DNA extraction experiment was performed using four different protocols: two using columns, an acid-base one, and a set of "DNA-extran". Control of the purity of the isolated DNA and determination of its concentration was determined using the Implen NanoPhotometer N60 spectrophotometer. The highest concentration of isolated DNA was obtained using the acid-base method, while the purest preparations were isolated using a set of "DNA-extran" and "K-Sorb" columns.

Key words: *Arthrospira platensis*, DNA extraction, spectrophotometry.