

Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из листьев гледичии трехколючковой (*Gleditsia triacanthos* L.)

А. Ф. Рябуха[✉], П. А. Кузьмин

Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук, Волгоград, Россия

[✉]E-mail: ryabuha-af@vifanc.ru

Аннотация. В настоящее время молекулярно-генетические методы с использованием ДНК-маркеров все шире используются в исследованиях полиморфизма различных популяций древесно-кустарниковых растений. **Целью** данной работы явились оценка и подбор протоколов выделения и очистки ДНК из листьев гледичии трехколючковой (*Gleditsia triacanthos* L.) для дальнейших исследований с применением ДНК-маркирования. **Методы.** Для выделения ДНК из листовой пластинки гледичии трехколючковой использовали четыре протокола. В трех протоколах выделения для лизиса клеток использовали анионный детергент додецилсульфат натрия, для очистки от полисахаридов и белков ацетат калия. В четвертом протоколе для лизиса клеток использовали катионный сурфактант цетилтриметил бромид аммония, очистку экстракта проводили смесью хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1). Осаждение выделенной ДНК проводили изопропанолом, оценку качества – методом спектрофотометрии, горизонтального электрофореза и ПЦР Real-time с двумя типами праймеров. **Результаты.** Подобраны оптимальные условия экстракции ДНК из образцов гледичии трехколючковой, содержащей большое количество метаболитов, влияющих на качество выделенного экстракта. Методом электрофореза установлено, что и протокол выделения с додецилсульфатом натрия, и протокол выделения с цетилтриметил бромидом аммония позволяют получить достаточное количество ДНК. Наиболее очищенная ДНК была получена по третьему протоколу с использованием додецилсульфата натрия и дитиотреитола и по четвертому протоколу с использованием цетилтриметиламмония бромидом. Результаты ПЦР полученных образцов с праймерами ITS и psbI-psbK свидетельствуют о получении достаточного количества продукта и воспроизводимости ISSR-маркеров. **Научная новизна** работы состоит в выборе оптимального метода экстракции ДНК из листьев гледичии трехколючковой, являющейся сложным объектом, содержащим большое количество потенциальных ингибиторов ПЦР. Протокол с додецилсульфатом натрия и дитиотреитоном позволил получить ДНК в нужном количестве и приемлемого качества.

Ключевые слова: экстракция ДНК, цетилтриметиламмония бромид, додецилсульфат натрия, гледичия трехколючковая, молекулярные маркеры

Для цитирования: Рябуха А. Ф., Кузьмин П. А. Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из листьев гледичии трехколючковой (*Gleditsia triacanthos* L.) // Аграрный вестник Урала. 2024. Т. 24, № 02. С. 207–217. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-02-207-217>.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания «Поиск селекционно-ценного генетического материала для создания новых генотипов древесно-кустарниковых пород методами молекулярной селекции» (№ FNFE-2022-0009).

Дата поступления статьи: 16.06.23, **дата рецензирования:** 19.09.2023, **дата принятия:** 10.10.2023.

Selection and optimization of DNA extraction methods from the leaves of *Gleditsia triacanthos* L.

A. F. Ryabukha[✉], P. A. Kuzmin

Federal Research Center of Agroecology, Integrated Land Reclamation and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences, Volgograd, Russia

[✉]E-mail: ryabuha-af@vfanc.ru

Abstract. Currently, molecular genetic methods using DNA markers are increasingly used in studies of polymorphism of various populations of woody and shrubby plants. **The purpose** of this work was the evaluation and selection of protocols for the isolation and purification of DNA from the leaves of *Gleditsia triacanthos* L. for further studies using DNA labeling. **Methods.** Four protocols were used to isolate DNA from the leaf blade of *Gleditsia triacanthos* L. Anionic detergent sodium dodecyl sulfate was used in three isolation protocols for cell lysis, potassium acetate was used for purification from polysaccharides and proteins. In the fourth protocol, a cationic surfactant cetyltrimethyl ammonium bromide was used for cell lysis, the extract was purified with a mixture of chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1). Precipitation of the isolated DNA was carried out with isopropanol. The quality of the isolated DNA was evaluated by spectrophotometry, horizontal electrophoresis and Real-time PCR with two types of primers. **Results.** Optimal conditions for DNA extraction from samples of *Gleditsia triacanthos* L. containing a large number of metabolites affecting the quality of the isolated extract were selected. By electrophoresis, it was found that both the isolation protocol with sodium dodecyl sulfate and the isolation protocol with cetyltrimethyl ammonium bromide make it possible to obtain a sufficient amount of DNA. The most purified DNA was obtained by the third protocol using sodium dodecyl sulfate and dithiothreitol and by the fourth protocol using cetyltrimethylammonium bromide. The results of PCR of the obtained samples with ITS and psbI-psbK primers indicate that a sufficient amount of product has been obtained and the reproducibility of ISSR markers. **The scientific novelty** of the work consists in choosing the optimal method of DNA extraction from the leaves of *Gleditsia triacanthos* L., which is a complex object containing a large number of potential PCR inhibitors. The protocol with sodium dodecyl sulfate and dithiothreitol made it possible to obtain DNA in the right amount and of acceptable quality.

Keywords: DNA extraction, CTAB, sodium dodecyl sulfate, *Gleditsia triacanthos*, molecular markers

For citation: Ryabukha A. F., Kuzmin P. A. Selection and optimization of DNA extraction methods from the leaves of *Gleditsia triacanthos* L. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2024; 24 (02): 207–217. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-02-207-217>. (In Russ.)

Acknowledgments. The study was carried out within the framework of the State assignment “Search for breeding-valuable genetic material for the creation of new genotypes of tree and shrub species using molecular breeding methods” (No. FNFE-2022-0009).

Date of paper submission: 16.06.23, **date of review:** 19.09.2023, **date of acceptance:** 10.10.2023.

Постановка проблемы (Introduction)

В настоящее время молекулярно-генетический анализ растений осуществляется с различными целями: создание устойчивых гетерозиготных популяций с учетом экологических особенностей, видоидентификация и филогенетика, определение пола растений, изучение и сохранение генетических ресурсов растений, исследование полиморфизмов в различных биотопических популяциях и др. [1; 2]. Путем ДНК-маркирования проводятся выявление ценных генотипов, мониторинг генетической изменчивости исследуемого вида, его адаптации к негативным факторам среды обитания [3]. Точное определение уровня генетического разнообразия может быть востребовано для изучения и сохранения редких и исчезающих видов, в селекционных

программах различного направления, в том числе для древесно-кустарниковых растений [4; 5].

Большой интерес для защитного лесоразведения в засушливых районах вызывает гледичия трехколючковая (*Gleditsia triacanthos* L.), род гледичия (*Gleditsia*). Это листопадное дерево высотой до 45 м с крупными колючками на ветках, произрастающее на периодически затопляемых иллювиальных, дренированных почвах, выдерживает небольшое засоление почвенного слоя, отличается засухоустойчивостью и морозоустойчивостью. Гледичия трехколючковая признана перспективным видом для внедрения во вновь создаваемые барьерные зоны защитных лесных насаждений в степных и предгорных районах в связи с высокой засухоустойчивостью [6; 7].

Интерес к данному виду обусловлен также высоким содержанием биологически активных веществ: тритерпеновых сапонинов, комплекса пектинов, полисахаридов, фенольных соединений, аминокислот, что позволяет использовать полученные на его основе препараты в медицинской практике в качестве противоаллергических, противоопухолевых, противовоспалительных, антимикробных, противогрибковых, противовирусных, тонизирующих средств [8; 9].

Одним из необходимых условий проведения молекулярно-генетических исследований является работа с большим количеством образцов изолированной чистой ДНК. Несмотря на рутинность самой процедуры выделения и наличие протоколов экстракции ДНК из различных видов растений, решение проблемы получения чистой недеградированной ДНК из растительных объектов все еще остается определяющим первым этапом в любой сфере использования молекулярно-генетических подходов для изучения растительных организмов. Решающим в самой процедуре экстракции и очистки является правильный подбор условий, т. к. компоненты матрицы образцов различны для различных растений и могут сильно мешать выделению нуклеиновых кислот и/или последующему анализу. Возможно использование специализированных коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот, однако они могут не подходить для конкретного вида растения и быть коммерчески недоступны для некоторых лабораторий, особенно при большом количестве анализов. Выбор определенного метода и/или коммерческого набора сильно зависит от оснащенности лаборатории, возможности работы с токсичными реагентами и квалификации персонала [10].

Первым и важнейшим этапом экстракции ДНК является лизис клеток, который может проводиться различными методами: механическим, химическим, термическим, ультразвуковым, ферментативным, электрическим или сочетать в себе несколько различных методов [11]. Часто молекулу ДНК экстрагируют из листовой пластинки. Однако ДНК можно извлечь из различных частей семян, проростков, камбия, почек и др. [12]. В зависимости от физико-химических свойств содержащихся в растениях первичных и вторичных метаболитов, во многом совпадающих со свойствами нуклеиновых кислот, выбирают подходящий метод экстракции и анализа ДНК. Для лизиса клеточной стенки и перевода ДНК в экстракционный раствор чаще всего используют детергенты додецилсульфат натрия и цетилтриметил бромид аммония (ЦТАБ) [13; 14]. Для осаждения белков и полисахаридов применяют меркаптоэтанол и дитиотреитол (ДТТ), для связывания полифенольных соединений – поливинилпирролидон (ПВП) [15; 16].

На следующем этапе происходит отделение нуклеиновых кислот от других веществ, содержащихся в клетке, и матрицы образца. При этом желательно получение максимально чистого целевого продукта с использованием по возможности малотоксичных реагентов. Важно также максимально избежать деградации образцов ДНК, которая может привести к неправильной спектрофотометрической оценке концентрации ДНК и ее завышению вследствие явления гиперхромизма. Кроме того, данные препараты в дальнейшем малоприспособны для работы по изучению и манипуляции с крупными фрагментами ДНК [17].

Третьим и последним этапом экстракции является очистка нуклеиновых кислот, т. е. удаление ингибиторов полимеразной цепной реакции (ПЦР) [18].

Согласно литературным данным, в листьях гледичии трехколючковой содержится значительное количество белков, полисахаридов и полифенолов, следовательно, актуальными являются подбор и оценка различных методов экстракции растительного материала, позволяющих получить очищенную ДНК с максимальным выходом для последующей оценки полиморфизма различных популяций гледичии трехколючковой. Также желательно, чтобы данный протокол выделения нуклеиновых кислот был оптимальным по стоимости, трудоемкости и продолжительности анализа.

Целью исследования явилось сравнение четырех протоколов выделения и очистки ДНК из листьев гледичии трехколючковой и выбор оптимального протокола для дальнейших исследований с применением ДНК-маркирования.

Методология и методы исследования (Methods)

ДНК выделяли из листьев гледичии трехколючковой, полученных от семян, выращенных в лабораторных условиях. Измельчение материала и экстракцию ДНК проводили на гомогенизаторе Precellys 24 (Франция).

Для изготовления экстракционных буферов использовали следующие реактивы: трис, чистота 99,5 % (Китай), трилон Б, ч. д. а. (Китай), натрий хлористый, ч. д. а. (ООО «ХлоренХима», Россия), поливинилпирролидон 10 000 (K15) (AppliChem), 2-меркаптоэтанол, степень чистоты $\geq 99\%$, (Германия), дитиотреитол, степень чистоты $> 99\%$ (Китай).

Для очистки гомогенатов применяли реактивы: натрий уксуснокислый, б/в, х. ч. (Китай), трихлорметан, х. ч. (АО «Экос-1», Россия), изоамиловый спирт, ч. д. а. (АО «Экос-1», Россия).

Для изготовления агарозных гелей использовали агарозу универсальную (LE) (ООО НПФ «ПанЭко», Россия). Для изготовления трис-ацетатного буфера использовали трис, трилон Б и уксусную кислоту ледяную, х. ч., чистота 99,8 % (АО «Экос-1»,

Россия). В качестве интеркалирующего агента для выявления нуклеиновых кислот добавляли раствор бромистого этидия (Индия).

Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза Bio-Rad (США).

Аmplификацию проводили на термоциклере Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения полимеразной цепной реакции использовали готовую смесь 5x qPCRmix-HS SYBR+LowROX буфер, праймеры ITS1 и ITS2, psbK и psbI («Евроген», Россия).

С целью получения ДНК с максимальным выходом и минимальным загрязнением образцов вторичными метаболитами апробировали четыре протокола экстракции и очистки ДНК (таблица 1). Протоколы 1–3 основаны на лизисе клеток с детергентом додецилсульфатом натрия, но отличались составом экстракционного буфера. В протоколах 1 и 2 в качестве восстановителя и антиоксиданта в составе экстракционного буфера использовали меркаптоэтанол, к которому в первом случае добавляли также ПВП для очистки от полифенольных соединений. В протоколе 3 в качестве восстановителя использовали дитиотреитол, который также способствует разрушению дисульфидных связей, предотвращая образование димеров «тиолированной» ДНК в растворе. Отличались также способы очистки экстрактов от вторичных метаболитов. В протоколах 1–3 для осаждения белков и полисахаридов использовали ацетат калия, в протоколе 4 гомогенат очищали смесью хлороформа с изоамиловым спиртом (таблица 1). Проверка качества выделенной ДНК проводилась методами спектрофотометрии и горизонтального электрофореза.

Концентрацию (нг/мкл) полученной ДНК определяли на спектрофотометре Spectrostar (Labtec) в кювете с объемом ячейки 50 мкл и толщиной поглощающего слоя 10 мм. Данный метод позволяет также сделать вывод о чистоте полученного экстракта. Максимум поглощения нуклеиновых кислот находится в области длины волны 260 нм, вещества полифенольной природы обычно поглощают свет в области 230 нм, белки – в области 280 нм, поэтому мы использовали соответствующие спектральные соотношения для оценки чистоты выделенной ДНК.

Оценку качества выделенной ДНК проводили методом горизонтального электрофореза, используя 2,5-процентный агарозный гель, буферный раствор на основе трис-ацетата при напряжении 50 В, время проведения анализа – 90 мин. Смесь для электрофореза включала в себя следующие компоненты: 3 мкл пробы и 1 мкл загрузочного буфера, который состоял из бромфенолового синего, ксиленианола и глицерина. В агарозный гель и раствор буфера перед началом электрофореза вносили бромистый этидий (0,003 %). Для идентификации размеров по-

лученных полос ДНК использовали маркер, имеющий молекулярную массу 250 + bp (DNA Ladder).

Для оценки качества выделенной ДНК использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (PCR-real time). В основе метода лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации. Основными преимуществами данного метода являются быстрое обнаружение и количественное определение целевых последовательностей ДНК в различных матрицах, широкий динамический диапазон для количественного определения.

Аmplификацию проводили в присутствии красителя ROX. Использовали два типа праймеров:

1. Ядерные последовательности ITS, применяемые для определения межгенных спейсеров ITS1 и ITS2 (некодирующие последовательности ДНК, расположенные как внутри, так и между кластерами генов). Данные праймеры удобны для ПЦР-анализа и секвенирования и присутствуют у всех групп живых организмов. У покрытосеменных протяженность составляет 500–700 п. о.

Прямой праймер ITS1 – TCCGTAGGTGAACCTGCGG.

Обратный праймер ITS2 – TCCTCCGCTTATTGATATGC.

Выбор данных участков связан с присутствием в них нуклеотидных вставок и делеций (удалений), что является удобным для исследований различий внутри близкородственных организмов.

2. Хлоропластные маркеры psbK и psbI, являющиеся продуктами секвенирования межгенного спейсера, широко используются с различными целями в молекулярно-генетических исследованиях [19].

Данный фрагмент амплифицируется с помощью праймеров:

psbK – TTAGCCTTTGTTTGGCAAG.

psbI – AGAGTTTGAGAGTAAGCAT.

Смешивали в пробирке на 0,2 мл следующие компоненты: деионизированная вода – 14 мкл, прямой праймер – 2 мкл (из раствора с концентрацией праймера 10 мкМ), обратный праймер – 2 мкл (из раствора с концентрацией праймера 10 мкМ), 5x qPCRmix-HS SYBR + LowROX буфер – 5 мкл, ДНК-матрица – 2 мкл, общий объем смеси – 25 мкл.

Для праймеров ITS реакционную смесь нагревали при температуре 95 °С 10 минут, затем повторяли 40 циклов амплификации: 30с при 95 °С, 1 мин. при 56 °С, 1 мин. при 72 °С, элонгация 10 мин. при 72 °С.

Для праймеров psbK и psbI реакционную смесь нагревали при температуре 95 °С 5 мин., затем повторяли 40 циклов амплификации: 30 с при 95 °С, 1 мин. при 50 °С, 1 мин. при 68 °С, элонгация 10 мин. при 68 °С.

Таблица 1
Основные этапы протоколов выделения ДНК

Этап получения ДНК	Протокол 1	Протокол 2	Протокол 3	Протокол 4
Гомогенизация	Измельчение 100 мг листовой пластинки в 0,8 мл буфера состава: 100 mM трис-НСl, 50 mM ЭДТА, и 500 mM NaCl (рН 8,0), 2 % ПВП 10 000, 0,2 % (об/об) 2-меркаптоэтанола (добавляется непосредственно перед экстракцией)	Измельчение 100 мг листовой пластинки в буфере состава: 100 mM трис-НСl, 50 mM ЭДТА, и 500 mM NaCl (рН 8,0), 2 % ПВП 10 000, 0,2 % (об/об) 2-меркаптоэтанола (добавляется непосредственно перед экстракцией)	Измельчение 100 мг листовой пластинки в 0,8 мл буфера состава: 100 mM трис-НСl, 50 mM ЭДТА, и 1,4 M NaCl (рН 8,0), 2 % ПВП 10 000, 2 % PVP 10 000, 2 % 2-меркаптоэтанола (добавляется непосредственно перед экстракцией)	Измельчение 100 мг листовой пластинки в 0,8 мл подогретого до 65 °С буфера состава: 2 % ЦТАБ, 1,4 M NaCl, 0,1 M трис-НСl, рН 8,0, 20 mM ЭДТА, 2 % ПВП 10 000, 2 % 2-меркаптоэтанола (добавляется непосредственно перед экстракцией)
Экстракция и лизис клеток	Добавление к гомогенату 100 мкл 20 % додецилсульфата натрия, инкубирование в твердотельном термостате при 65 °С 15 мин. Пробу осторожно перемешивают, избегая встряхивания, т. к. буфер пенится и ДНК фрагментируется	Добавление к додецилсульфату натрия, инкубирование в твердотельном термостате при 65 °С 15 мин. Пробу осторожно перемешивают, избегая встряхивания, т. к. буфер пенится и ДНК фрагментируется	Добавление к гомогенату 100 мкл 20 % додецилсульфата натрия, инкубирование в твердотельном термостате при 65 °С 30 мин. при периодическом перемешивании, без встряхивания	Выдерживание гомогената в твердотельном термостате при 65 °С 30 мин. при периодическом перемешивании, без встряхивания
Очистка от метаболитов (белков, полисахаридов, полифенолов)	Добавление 225 мкл 2M ацетата калия, осторожное перемешивание, выдерживание при 4 °С 15 мин., центрифугирование при 12 000 g в течение 10 мин. при комнатной температуре. Отбирают 600–700 мкл надосадочной жидкости	Добавление 225 мкл 2M ацетата калия, осторожное перемешивание, выдерживание при 4 °С 15 мин., центрифугирование при 12 000 g в течение 10 мин. при комнатной температуре. Отбирают 600–700 мкл надосадочной жидкости	Добавление смеси хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1), перемешивание 20 мин., центрифугирование при 12 000 g, 15 мин.	Добавление смеси хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1), перемешивание 20 мин., центрифугирование при 12 000 g, 15 мин.
Получение ДНК	Добавление к надосадочной жидкости равного объема холодного 99 % изопропанола, выдерживание в холодилнике 1 ч, отделение ДНК центрифугированием после двойного промывания осадка 70 % спиртом, удаление спирта при нагревании 10 мин. до 45 °С, растворение ДНК в 100 мкл ТЕ-буфера. Полученную ДНК хранить при –20 °С для последующего анализа	Добавление к надосадочной жидкости равного объема холодного 99 % изопропанола, выдерживание в холодилнике 1 ч, отделение ДНК центрифугированием после двойного промывания осадка 70 % спиртом, удаление спирта при нагревании 10 мин. до 45 °С, растворение ДНК в 100 мкл ТЕ-буфера. Полученную ДНК хранить при –20 °С для последующего анализа	Добавление к надосадочной жидкости равного объема холодного 99 % изопропанола, выдерживание в холодилнике 1 ч, отделение ДНК центрифугированием после двойного промывания осадка 70 % спиртом, удаление спирта при нагревании 10 мин. до 45 °С, растворение ДНК в 100 мкл ТЕ-буфера. Полученную ДНК хранить при –20 °С для последующего анализа	Добавление к надосадочной жидкости равного объема холодного 99 % изопропанола, выдерживание в холодилнике 1 ч, отделение ДНК центрифугированием после двойного промывания осадка 70 % спиртом, удаление спирта при нагревании 10 мин. до 45 °С, растворение ДНК в 100 мкл ТЕ-буфера. Полученную ДНК хранить при –20 °С для последующего анализа

Table 1
The main stages of DNA isolation protocols

The stage of obtaining DNA	Protocol 1	Protocol 2	Protocol 3	Protocol 4
Homogenization	Grinding of 100 mg of leaf blade in 0.8 ml of buffer composition: 100 mM tris-HCl, 50 mM EDTA, and 500 mM NaCl (pH 8.0), 2 % PVP 10 000, 0.2 % (by volume) 2-mercaptoethanol (added immediately before extraction)	Grinding of 100 mg of a leaf blade in 0.8 ml of a buffer composition heated to 65 °C: 2 % TAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 2 % PVP 10 000, 2 % 2-mercaptoethanol (added immediately before extraction)	Grinding of 100 mg of a leaf blade in 0.8 ml of a buffer composition heated to 65 °C: 2 % TAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 2 % PVP 10 000, 2 % 2-mercaptoethanol (added immediately before extraction)	Grinding of 100 mg of a leaf blade in 0.8 ml of a buffer composition heated to 65 °C: 2 % TAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 2 % PVP 10 000, 2 % 2-mercaptoethanol (added immediately before extraction)
Extraction and lysis of cells	Addition of 20 % sodium dodecyl sulfate to 100 µl homogenate, incubation in a solid-state thermostat at 65 °C for 15 min. The sample is carefully mixed, avoiding shaking, because the buffer foams and DNA fragments	Addition of 20 % sodium dodecyl sulfate to 100 µl homogenate, incubation in a solid-state thermostat at 65 °C for 15 min. The sample is carefully mixed, avoiding shaking, because the buffer foams and DNA fragments	Keeping the homogenate in a solid-state thermostat at 65 °C for 30 min., stirring periodically, without shaking.	Keeping the homogenate in a solid-state thermostat at 65 °C for 30 min., stirring periodically, without shaking.
Purification from metabolites (proteins, polysaccharides, polyphenols)	Addition of 225 µl 2M potassium acetate, careful stirring, holding at 4 °C for 15 min., centrifugation at 12 000 g for 10 min. at room temperature. 600–700 µl of the supernatant fluid is taken	Addition of 225 µl 2M potassium acetate, careful stirring, holding at 4 °C for 15 min., centrifugation at 12 000 g for 10 min. at room temperature. 600–700 µl of the supernatant fluid is taken	Addition of a mixture of chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1), stirring for 20 min., centrifugation at 12000 g, 15 min.	Addition of a mixture of chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1), stirring for 20 min., centrifugation at 12000 g, 15 min.
Obtaining DNA	Addition of an equal volume of cold 99 % isopropanol to the filler liquid, refrigerating for 1 hour, separating DNA by centrifugation, washing the sediment twice with 70 % alcohol, removing alcohol when heated for 10 min. to 45 °C, dissolving DNA in 100 ml of TE buffer. The resulting DNA should be stored at –20 °C for subsequent analysis	Addition of an equal volume of cold 99 % isopropanol to the filler liquid, refrigerating for 1 hour, separating DNA by centrifugation, washing the sediment twice with 70 % alcohol, removing alcohol when heated for 10 min. to 45 °C, dissolving DNA in 100 ml of TE buffer. The resulting DNA should be stored at –20 °C for subsequent analysis	Addition of a mixture of chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1), stirring for 20 min., centrifugation at 12000 g, 15 min.	Addition of a mixture of chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1), stirring for 20 min., centrifugation at 12000 g, 15 min.

Полученные ампликоны разделяли методом горизонтального электрофореза в 2-процентном агарозном геле, в трис-ацетатном буфере при напряженности электрического поля 75 В в течение 60 мин.

Визуализацию результатов электрофореза проводили в гель-документирующей системе (Invitrogen iBright, США), в проходящем ультрафиолетовом свете после связывания фрагментов ДНК с бромистым этидием.

Результаты (Results)

В результате мы применили и сравнили несколько протоколов экстракции и очистки ДНК с анионным детергентом додецилсульфатом натрия и катионным сурфактантом цетилтриметил аммония бромидом и оценили качество выделенной ДНК. Средние концентрации образцов ($n = 6$) и спектральные соотношения $\lambda_{260} / \lambda_{280}$, характеризующие степень очистки ДНК от белков, и $\lambda_{260} / \lambda_{235}$, характеризующие степень очистки от полифенольных соединений, представлены в таблице 2.

На рис. 1 представлен спектр поглощения для образцов, полученных по четвертому протоколу со ЦТАБ (А) и третьему протоколу с додецилсульфатом натрия (Б). Видно, что оба образца имеют четко выраженный максимум при 260 нм, однако для метода со ЦТАБ характерна меньшая степень очистки образца от белков и полифенолов.

Для определения степени деградации молекул в полученных экстрактах был проведен горизонтальный электрофорез в агарозном геле, полученные электрофореграммы представлены на рис. 2.

В результате проведения ПЦР в реальном времени с праймером ITS показана амплифицируемость или неамплифицируемость выделенных образцов ДНК на основании величины порогового цикла амплификации C_t . Результаты реакции ПЦР представлены на рис. 2.

Для визуализации продуктов ПЦР, полученных по третьему протоколу, был проведен горизонтальный электрофорез в 2-процентном агарозном геле с бромистым этидием (0,003 %), электрофореграмма представлена на рис.4, а.

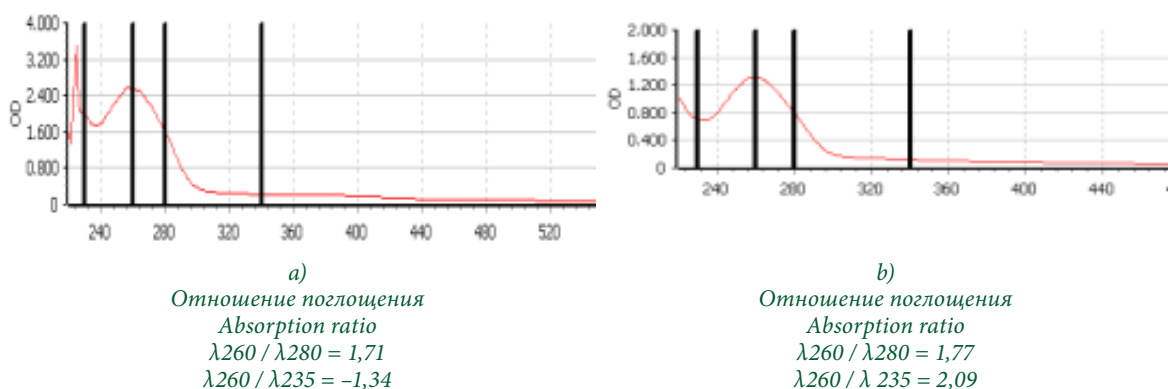
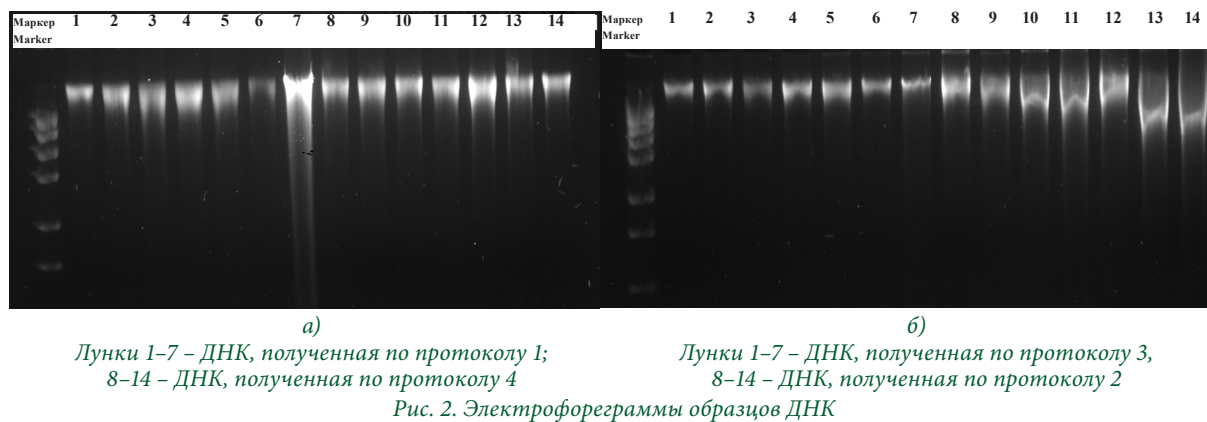


Рис. 1. Спектры поглощения для препаратов ДНК, полученных по протоколу со ЦТАБ (а) и додецилсульфатом натрия (б). По оси абсцисс длина волны, нм. По оси ординат поглощение, ед.
Fig. 1. Absorption spectra for DNA preparations obtained according to the protocol with CTAB (a) and sodium dodecyl sulfate (b). Along the abscissa axis, the wavelength, nm. On the ordinate axis, absorption, units



а)
Wells 1-7 – DNA obtained according to protocol 1;
8-14 – DNA obtained according to protocol 4

б)
Wells 1-7 – DNA obtained according to protocol 3,
8-14 – DNA obtained according to protocol 2

Fig. 2. Electrophoretograms of DNA samples

Таблица 2
Концентрация и спектральные соотношения образцов ДНК

Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК	Протокол 1	Протокол 2	Протокол 3	Протокол 4
Концентрация, нг/мкл	76,14 ± 20,38	289,17 ± 37,68	86,62 ± 29,4	108,3 ± 37,46
Соотношение $\lambda 260 / \lambda 280$	1,42 ± 0,07	1,53 ± 0,03	1,75 ± 0,03	1,70 ± 0,05
Соотношение $\lambda 260 / \lambda 235$	0,97 ± 0,06	1,56 ± 0,14	1,7 ± 0,21	1,70 ± 0,21

Table 2
Concentration and spectral ratios of DNA samples

Spectrophotometric characteristics of DNA samples	Protocol 1	Protocol 2	Protocol 3	Protocol 4
Concentration, ng/ml	76.14 ± 20.38	289.17 ± 37.68	86.62 ± 29.4	108.3 ± 37.46
Ratio $\lambda 260 / \lambda 280$	1.42 ± 0.07	1.53 ± 0.03	1.75 ± 0.03	1.70 ± 0.05
Ratio $\lambda 260 / \lambda 235$	0.97 ± 0.06	1.56 ± 0.14	1.7 ± 0.21	1.70 ± 0.21

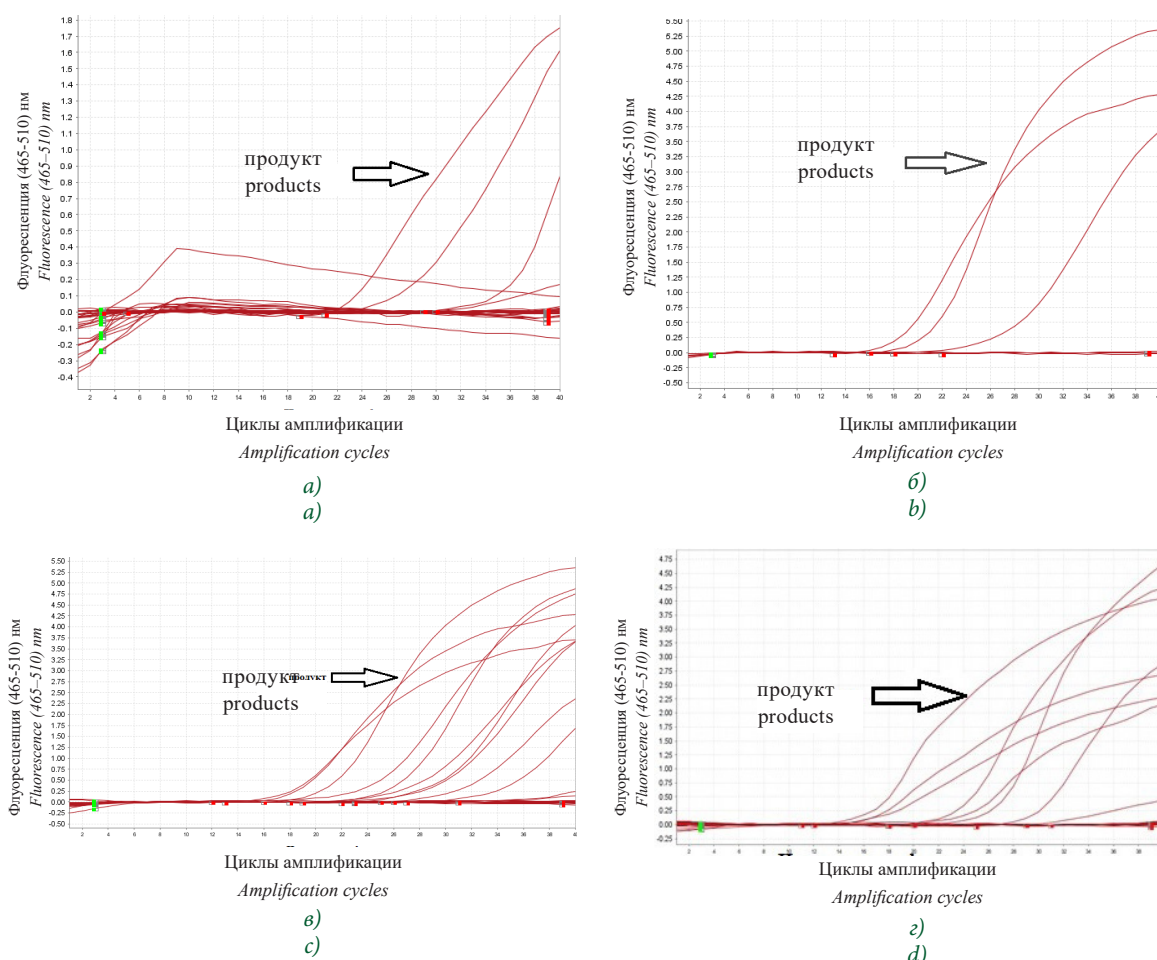


Рис. 3. Кривые амплификации ITS последовательности с использованием ДНК. По оси абсцисс – число циклов амплификации, по оси ординат – интенсивность флуоресценции. а) продукты амплификации ДНК, выделенной по протоколу 1, б) по протоколу 2, в) по протоколу 3, г) по протоколу 4

Fig. 3. ITS sequence amplification curves using DNA. On the abscissa axis is the number of amplification cycles, on the ordinate axis is the fluorescence intensity.

a) products of DNA amplification isolated according to the protocol 1, b) according to the protocol 2, c) according to the protocol 3, d) according to the protocol 4

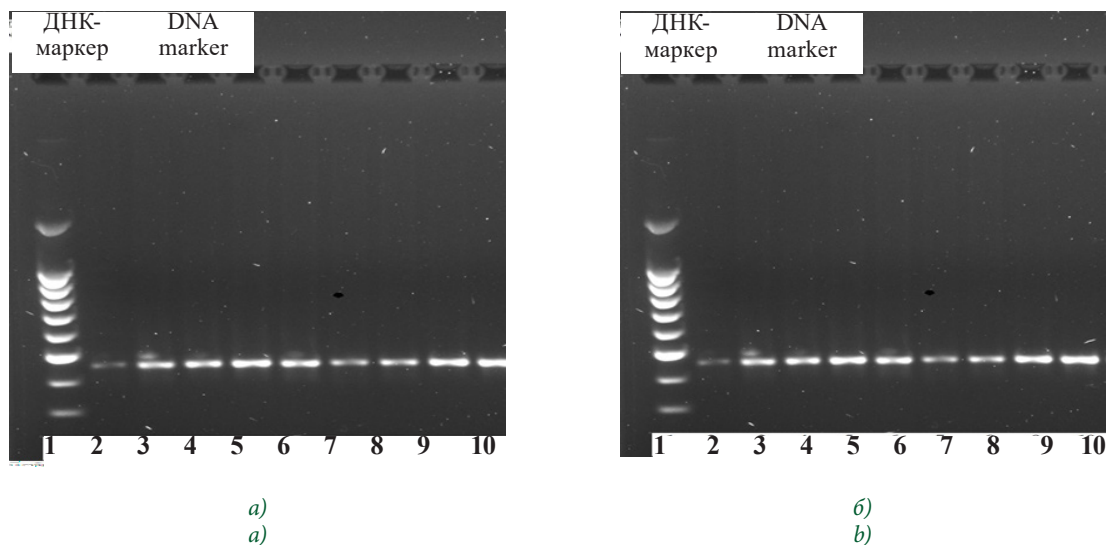


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР ДНК, полученной по третьему протоколу с праймером ITS (а), и с праймерами psbK-psbI (б). Лунка 1 – ДНК-маркер 250 + bp, лунки 2–10 – пробы ДНК
 Fig. 4. Electrophoregram of DNA PCR products obtained using the third protocol with ITS primer (a) and with psbK-psbI primers (b). Well 1 is a DNA marker 250 + bp, wells 2–10 are DNA samples

Также мы провели реакцию ПЦР ДНК, полученной по третьему протоколу, с праймерами psbK-psbI и разделили полученный продукт методом горизонтального электрофореза в 2-процентном агарозном геле с бромистым этидием (0,003 %), электрофореграмма представлена на рис. 4, б.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Как видно из представленных в таблице 2 данных, среднее значение концентрации ДНК по всем четырем протоколам достаточно высокое, но экстракты, полученные по первому и второму протоколу, были загрязнены примесями, о чем свидетельствовали низкие значения соотношений поглощения при $\lambda 260 / \lambda 280$ и $\lambda 260 / \lambda 235$. У ДНК, полученной по первому протоколу, в некоторых образцах отсутствовал четко выраженный максимум при длине волны 260 нм, следовательно, низкая концентрация меркаптоэтанола в экстракционном буфере не позволяет полностью очистить экстракт, особенно от белков и веществ полифенольной природы. При отсутствии в экстракционном буфере ПВП (второй протокол) среднее значение концентрации было высоким, но экстракты также были загрязненными, соотношения поглощений при $\lambda 260 / \lambda 280$ и $\lambda 260 / \lambda 235$ были менее 1,6, что свидетельствует о загрязнении экстракта ДНК белками и полифенолами. При выделении ДНК по третьему и четвертому протоколам очистка проб от белков и полифенолов была выше, о чем свидетельствуют спектры поглощения образцов и спектральные соотношения $\lambda 260 / \lambda 280$ и $\lambda 260 / \lambda 235$ (рис. 1, таблица 2).

Качественные и количественные показатели выделенной ДНК оценивали также методом горизонтального электрофореза. Высокомолекулярная геномная ДНК обычно выглядит в геле как четкая

полоса, расположенная очень высоко, недалеко от места нанесения на дорожку. Примеси РНК и деградированной ДНК выглядят как шмер, расположенный ниже. Как видно из представленных на рис. 2 данных, количество ДНК, полученной по протоколам 1 и 4, достаточно высокое, но шмер на электрофореграмме говорит о ее частичной деградации (рис. 2, а). На электрофореграмме образцов гледичии, полученных по протоколу 3, видно, что ДНК светится в виде довольно компактной полосы, расположенной ближе к лунке, что говорит о ее малой фрагментации и более высокой чистоте по сравнению с образцами, полученными по другим протоколам (рис. 2, б, лунки 1–7). Свечение рядом с лункой у образцов, полученных протоколом 2, указывает на наличие тяжелых фракций ДНК, также в ней присутствует значительное количество примесей (рис. 2, б, лунки 8–14).

В результате проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК, выделенной по протоколу с додецилсульфатом натрия и дитиотреитолом, в большинстве случаев наблюдалось достаточное количество продукта и хорошая воспроизводимость ISSR-маркеров, что свидетельствует об удалении ингибиторов ПЦР. При выделении ДНК ЦТАБ-методом реакция ПЦР проходила, но ПЦР-продукта было меньше (рис. 3).

Таким образом, в процессе работы с *Gleditsia triacanthos* L. установлено, что в листьях растения содержится значительное количество первичных и вторичных метаболитов, которые могут загрязнять образец ДНК в процессе проведения молекулярно-генетического анализа. При использовании буфера экстракции без ПВП и с низким содержанием меркаптоэтанола не удалось добиться получения

чистой ДНК. Протокол с использованием цетилтриметиламмония бромиды позволяет получить достаточное количество ДНК, но ее качество несколько ниже в сравнении с ДНК, полученной по третьему протоколу. Тщательной очистки экстракта ДНК из листьев растений гледичии трехколючковой от ингибирующих веществ удалось добиться,

используя для выделения протокол с додецилсульфатом натрия и дитиотреитолом. Пригодность образцов ДНК, полученных по данному протоколу, к дальнейшему молекулярно-генетическому анализу, подтверждена ПЦР с двумя праймерами – ITS и psbK-psbI.

Библиографический список

1. Кулаков Е. А., Воробьева Е. А., Сиволапов В. А., Карпеченко Н. А. Оценка полиморфизма дуба черешчатого (*Quercus robur*) с помощью SSR-анализа // Лесной вестник. 2021. Т. 25. № 4. С. 44–51. DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51.
2. Тараканов В. В., Паленова М. М., Паркина О. В., Роговцев Р. В., Третьякова Р. А. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор) // Лесохозяйственная информация. 2021. № 1. С. 100–143. DOI: 10.24419/LHI.2304-3083.2021.1.09.
3. Камнев А. М., Антонова О. Ю., Дунаева С. Е., Гавриленко Т. А., Чухина И. Г. Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 24. № 1. С. 20–30. DOI: 10.18699/VJ20.591.
4. Younis A., Ramzan F., Ramzan Y. et al. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review // Plants. 2020. No. 9 (10). DOI: 10.3390/plants9101374.
5. Li A., Ma M., Li H., He S., Wang S. Genetic Diversity and Population Differentiation of a Chinese Endangered Plant *Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Cheng f. // Genes. Vol. 14. No. 5. Article number 1020. DOI: 10.3390/genes14051020.
6. Корниенко В. О., Калаев В. Н. Эколого-морфологические и биомеханические особенности *Gleditsia triacanthos* L. в условиях антропогенного загрязнения города Донецка // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 2. С. 143–151.
7. Адамова Р. М., Казиев М.-Р. А. Эколого-биологические аспекты формирования защитных лесных насаждений в аридных районах // Аридные экосистемы. 2021. № 2 (87). С. 26–32. DOI: 10.24411/1993-3916-2021-10147.
8. Li J., Ye C. Genome-wide analysis of microsatellite and sex-linked marker identification in *Gleditsia sinensis* // BMC Plant Biology. 2020. Vol. 20 (1). Article number 338. DOI: 10.1186/s12870-020-02551-9.
9. Сальникова Н. А., Самотруева М. А., Коновалов Д. А. Химический состав и фармакологические свойства растений рода *Gleditsia* L. (обзор литературы) // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2019. № 3. С. 87–96. DOI: 10.21626/vestnik/2019-3/12.
10. Inglis P. W., Pappas M. R., Resende L. V., Grattapaglia D. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for highthroughput SNP genotyping and sequencing applications Plant Genetics Laboratory // PLOS ONE. 2018. Vol. 13. No. 10. Article number e0206085. DOI: 10.1371/journal.pone.0206085.
11. Islam M. S., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P. R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods // Micromachines. 2017. Vol. 8. Iss. 3. Article number 83. DOI: 10.3390/mi8030083.
12. Попова А. А., Гродецкая Т. А., Молчанов В. В., Евлаков Р. М. Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из различного растительного материала // Вестник ПГТУ. Серия: Лес. Экология. Природопользование. 2022. № 1 (53). С. 69–76. DOI: 10.25686/2306-2827.2022.1.69.
13. Ильницкая Е. Т., Макаркина М. В., Токмаков С. В., Наумова Л. Г. ДНК-маркерная идентификация локуса устойчивости к милдью Rpv10 в генотипах винограда // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. № 2 (27). С. 129–134. DOI: 10.18699/VJGB-23-18.
14. Barbier F. F., Chabikwa T. G., Ahsan M. U. et al. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing // Plant Methods. 2019. No. 15. Pp. 62–74. DOI: 10.1186/s13007-019-0447-3.
15. Ahmadi E., Kowsari M., Azadfar D., Jouzani G.S. Rapid and economical protocols for genomic and metagenomic DNA extraction from oak (*Quercus brantii* Lindl.) // Annals of Forest Science. 2018. Vol. 75. Article number 43. DOI: 10.1007/s13595-018-0705-y.
16. Петров Д. Г., Макарова Е. Д., Гермаш Н. Н., Антифеев И. Е. Методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток (обзор) // Научное приборостроение. 2019. Т. 29. № 4. С. 28–50.
17. Гучетль С. З., Золотавина М. Л., Григорьян А. А., Головатская А. В. Исследование качества ДНК для полимеразной цепной реакции, экстрагированной разными способами из подсолнечника // Масличные культуры. 2021. Вып. 1 (185). С. 32–42. DOI: 10.25230/2412-608X-2021-1-185-32-42.

18. Pencakowski B. M., Tokarski M., Jonkisz A., Czosnykowska-Łukacka M., Lenard E., Małodobra-Mazur M., Pencakowski B. M. et al. DNA profiling of oaks (*Quercus* spp.) // *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*. 2018. Vol. 68. No. 1. DOI: 10.5114/amsik.2018.75942.

19. Zhang Y., Song M., Li H., Sun H., Zhang Z. DNA barcoding identification of original plants of a rare medicinal material *Resina Draconis* and related *Dracaena* species // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2021. Vol. 46, No. 9. Pp. 2173–2181. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20210124.104.

Об авторах:

Анна Федоровна Рябуха, кандидат фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной селекции, Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук, Волгоград, Россия; ORCID 0000-0001-7659-0252, AuthorID 642665. E-mail: ryabuha-af@yfac.ru

Петр Анатольевич Кузьмин, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией молекулярной селекции, Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук, Волгоград, Россия; ORCID 0000-0002-1303-765X, AuthorID 680974

References

1. Kulakov E. E., Vorob'eva E. A., Sivolapov V. A., Karpechenko N. A. Petiolate Oak (*Quercus robur*) polymorphism evaluation by SSR-analyzing. *Forestry Bulletin*. 2021; 25 (4): 44–51. DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51. (In Russ.)

2. Tarakanov V. V., Palenova M. M., Parkina O. V., Rogovtsev R. V., Tret'yakova R. A. Forest Selective Breeding in Russia: Achievements, Challenges, Priorities (Overnien). *Forestry information*. 2021; 1: 100–143. DOI: 10.24419/LHI.2304-3083.2021.1.09. (In Russ.)

3. Kamnev A. M., Antonova O. Yu., Dunaeva S.E., Gavrilenko T.A., Chuxina I.G. Molecular markers in the genetic diversity studies of representatives of the genus *Rubus* L. and prospects of their application in breeding. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24 (1): 20–30. DOI: 10.18699/VJ20.591.4. (In Russ.)

4. Younis A., Ramzan F., Ramzan Y. et al. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review. *Plants*. 2020; 9 (10). DOI: 10.3390/plants9101374.

5. Li A., Ma M., Li H., He S., Wang S. Genetic Diversity and Population Differentiation of a Chinese Endangered Plant *Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Cheng f. *Genes*; 14 (5): 1020. DOI: 10.3390/genes14051020.

6. Kornienko V. O., Kalaev V. N. Ecological, morphological and biomechanical characteristics of *Gleditsia triacanthos* l. in the conditions of anthropogenic pollution of the city of Donetsk. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2018; 2: 143–151. (In Russ.)

7. Adamova R. M., Kaziev M.-R. A. Ecological and biological aspects of the formation of protective forest plantations in arid areas. *Arid ecosystems*. 2021; 2 (87): 26–32. DOI: 10.24411/1993-3916-2021-10147. (In Russ.)

8. Li Jianjun, Ye Chenglin. Genome-wide analysis of microsatellite and sex-linked marker identification in *Gleditsia sinensis*. *BMC Plant Biol.* 2020. 20 (1): 338. DOI: 10.1186/s12870-020-02551-9.

9. Sal'nikova N. A., Samotrueva M. A., Konovalov D. A. The chemical composition and pharmacological properties of plants of *Gleditsia* l. (literature review). *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2019; 3: 87–96. DOI: 10.21626/vestnik/2019-3/12. (In Russ.)

10. Inglis P. W., Pappas M. R., Resende L. V., Grattapaglia D. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for highthroughput SNP genotyping and sequencing applications Plant Genetics Laboratory. *PLOS ONE*. 2018. 18; 13 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0206085.

11. Islam M.S., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P.R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. 2017; 8 (3): 83. DOI: 10.3390/mi8030083.

12. Popova A. A., Grodetskaya T. A., Molchanov V. V., Evlakov P. M. Selection and optimization of DNA extraction methods from various plant materials. *Vestnik of Volga State University of Technology. Series: Forest Ecology. Nature Management*. 2022; 1 (53): 69–76. DOI: 10.25686/2306-2827.2022.1.69. (In Russ.)

13. Il'nitskaya E. T., Makarkina M. V., Tokmakov S. V., Naumova L. G. DNA marker identification of downy mildew resistance locus *Rpv10* in grapevine genotypes. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023; 2 (27): 129–134. DOI: 10.18699/VJGB-23-18. (In Russ.)

14. Barbier F.F., Chabikwa T.G., Ahsan M.U. et al. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant Methods*. 2019; 15: 62. DOI: 10.1186/s13007-019-0447-3.

15. Ahmadi E., Kowsari M., Azadfar D., Jouzani G. S. Rapid and economical protocols for genomic and metagenomic DNA extraction from oak (*Quercus brantii* Lindl.). *Annals of Forest Science*. 2018; 75: 43. DOI: 10.1007/s13595-018-0705-y.
16. Petrov D. G., Makarova E. D., Germash N. N., Antifeev I. E. Methods for isolation and purification of DNA from cell lysates (review). *Nauchnoe priborostroenie*. 2019; 29 (4): 28–50. (In Russ.)
17. Guchetl' S. Z., Zolotavina M. L., Grigor'yan A. A., Golovatskaya A. V. Quality of DNA for PCR extracted from sunflower with different methods. *Maslichnye kul'tury*. 2021; 1 (185): 32–42. DOI: 10.25230/2412–608X–2021–1–185–32–42. (In Russ.)
18. Pencakowski B. M., Tokarski M., Jonkisz A., Czosnykowska-Łukacka M., Lenard E., Małodobra-Mazur M., Pencakowski B. M. et al. DNA profiling of oaks (*Quercus* spp.) *Arch Med Sadowej Kryminol*. 2018. 68 (1): 1–9. DOI: 10.5114/amsik.2018.75942.
19. Zhang Y., Song M., Li H. , Sun H. , Zhang Z. DNA barcoding identification of original plants of a rare medicinal material *Resina Draconis* and related *Dracaena* species. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2021; 46 (9): 2173–2181. DOI 10.19540/j.cnki.cjcm.20210124.104. (In Chin.)

Authors' information:

Anna F. Ryabukha, candidate of pharmaceutical sciences, leading researcher at the laboratory of molecular breeding, Federal Research Center of Agroecology, Integrated Land Reclamation and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences, Volgograd, Russia; ORCID 0000-0001-7659-0252, AuthorID 642665.

E-mail: ryabuha-af@vfanc.ru

Petr A. Kuzmin, candidate of agricultural sciences, leading researcher, acting head of laboratory of molecular breeding, Federal Research Center of Agroecology, Integrated Land Reclamation and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences, Volgograd, Russia; ORCID 0000-0002-1303-765X, AuthorID 680-974