

УДК [641:613.26]:579.67

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ НА ИХ ОСНОВЕ

© 2010 Л.А. Остроумов, А.Ю. Просеков, А.Н. Архипов, О.В. Мудрикова

Кемеровский технологический институт пищевой промышленности

Поступила в редакцию 16.11.2010

Выделение ДНК многих видов растений считается трудной задачей из-за высокой концентрации вторичных метаболитов, таких как полисахариды и полифенолы. Выделение растительной ДНК из продуктов питания, полученных на их основе, задача еще более сложная. Это связано с присутствием белков, жиров и ингибиторов в пробах. Существует несколько методик для решения этой проблемы, также разработаны коммерческие наборы. В своем исследовании мы провели анализ существующих методик по выделению ДНК из растений и выделению растительной ДНК из продуктов питания на их основе.

Ключевые слова: *выделение ДНК, растения, продукты питания*

Прогресс в освоении методов ДНК-диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В последние годы принцип специфической ДНК-амплификации начали активно применять при разработке методов достоверного определения видовой принадлежности растительного сырья и многокомпонентных продуктов. По сравнению с традиционными способами видовой детекции, установление видовой принадлежности растительного сырья при помощи ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и возможностью количественного анализа. Кроме того, ДНК более устойчива в условиях технологического процесса, чем химические соединения [8]. Несмотря на то, что использование метода ПЦР для видовой идентификации тканей растительного происхождения получило высокую оценку зарубежных специалистов, в нашей стране это направление не нашло еще широкого практического применения в области санитарной экспертизы [7]. На начальном этапе выделения

ДНК из клеток растений требуется эффективное разрушение клеточных стенок. При этом очень важно свести к минимуму процессы фрагментации ДНК. Иногда эту трудность можно преодолеть при использовании лиофилизированного материала. На следующем этапе важно провести очистку освободившейся высокомолекулярной ДНК от многочисленных примесей, присутствующих в растительном экстракте – полисахаридов, белков, липидов, пигментов и других [1]. Поэтому возникает необходимость выбора метода под новый объект экспериментальным путем.

Разрушение клеток обычно проводят механическим путем в водных растворах в присутствии детергентов, растворяющих клеточные мембраны, и хелатирующих агентов, подавляющих нуклеазную активность. Для очистки от белковых примесей используют экстракцию фенолом или депротенинируют препараты ДНК с помощью протеиназы. Процедура дальнейшей очистки препарата в большей степени зависит от целей эксперимента. Концентрируют ДНК осаждением этанолом или изопропанолом. Для того, чтобы получить высокоочищенные ДНК, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения. Возможные примеси, которые могут ингибировать проведение анализа с использованием ПЦР, перечислены в табл.1 [2]. Неполное удаление ингибиторов, полисахаридов и полифенолов приводит к угнетению дальнейших ферментативных реакций в процессе ПЦР и вызывает деградацию ДНК после длительного хранения [5].

Остроумов Лев Александрович, доктор технических наук, профессор кафедры молока и молочных продуктов. E-mail: ostroumov@mail.ru

Просеков Александр Юрьевич, доктор технических наук, заведующий кафедрой «Бионанотехнологии». E-mail: aprosekov@rambler.ru

Архипов Александр Николаевич, кандидат технических наук, докторант кафедры молока и молочных продуктов. E-mail: arhipov@yandex.ru

Мудрикова Ольга Викторовна, аспирантка. E-mail: mudrikovaov@mail.ru

Таблица 1. Некоторые ингибиторы процесса ПЦР

Ингибитор	Концентрация ингибитора
SDS	>0,005%
фенол	>0,2%
этанол	>1%
изопропанол	>1%
ацетат натрия	>5 мМ
хлористый натрий	>25 мМ
EDTA	>0,05 мМ
гемоглобин	>1 мг/мл
мочевина	>20мМ

Традиционные методы выделения ДНК, которые основываются на использовании этанола для осаждения ДНК, приводят к тому, что полисахариды выпадают в осадок совместно с ДНК. Поэтому исследователи предпочитают использовать фенол-хлороформные методы [3]. Однако в этом случае качество выделяемого ДНК может быть не последовательным, в связи с неполным удалением ингибиторов ПЦР.

Цель работы: экспериментально установить условия высокопроизводительного метода выделения ДНК растений и растительной ДНК из продуктов питания на их основе. Это особенно важно для разработки методики определения видовой принадлежности растительного сырья и многокомпонентных продуктов.

Материалы и методы. В наши задачи входили выбор и оценка способов экстракции ДНК и их апробация на различном материале, включая пробы фруктов и готовые продукты питания, изготовленные с их применением. Для этого были выбраны четыре отличающиеся методики выделения ДНК:

1. Первый рекомендуется для быстрого выделения небольших количеств геномной ДНК растений с дополнительной экстракцией фенолом [4].

2. Второй метод основан на использовании в качестве детергента ЦТАБ (цетилтриэтиламоний бромид), который хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии ЦТАБ. При высоких концентрациях солей (0,7М NaCl) нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со ЦТАБ. При снижении концентрации соли ниже 0,4М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов ЦТАБ/нуклеиновая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе [6].

3. Коммерческий набор «Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов» с помощью ионного детергента ЦТАБ (ЗАО Синтол, Москва).

4. Коммерческий набор «ПРОБА–ЦТАБ» Комплект реагентов для выделения растительной ДНК (ООО «НПО ДНК–Технология», Москва).

Экспериментальная часть. Оценку эффективности выделения ДНК из проб продуктов питания на основе растительного сырья проводили посредством сопоставления результатов ПЦР с участием ДНК, выделенной четырьмя указанными способами. Параметрами оценки являлись уровень чувствительности и воспроизводимости результатов ПЦР с использованием того или иного способа экстракции ДНК, а также наличие или отсутствие фоновой амплификации, приводящей к появлению шумов на электрофореграмме. Чувствительность ПЦР – это количество исходного растительного компонента в анализируемом продукте питания. Воспроизводимость результатов ПЦР – количество положительных проб из 100 проведенных исследований. Результаты сравнительного анализа ПЦР с участием ДНК, выделенной различными способами, представлены в табл.2.

Таблица 2. Влияние методик выделения ДНК на эффективность ПЦР

Методика экстракции ДНК	Чувствительность ПЦР, %	Воспроизводимость результатов ПЦР	Наличие фоновой амплификации
с дополнительной экстракцией фенолом	0,5	83	+
в качестве детергента ЦТАБ	0,1	96	-
«Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов»	0,1	100	-
«ПРОБА–ЦТАБ»	0,1	100	-

Чувствительность ПЦР с использованием ДНК, выделенной при помощи ионных детергентов с последующей фенольной депротенизацией несколько ниже, что свидетельствует о неполном удалении ингибиторов. Чувствительность методов, основанных на использовании ЦТАБ в качестве детергента значительно выше и одинакова для всех методов выделения растительной ДНК. При помощи данных методов всегда удавалось избежать ингибирующего действия разнообразных компонентов, присутствующих в сложносоставных продуктах питания. Однако, несмотря на одинаково высокие показатели чувствительности ПЦР, оценка воспроизводимости результатов анализа при использовании указанных методик подготовки проб показала, что в ходе применения некоммерческого способа, в котором качестве детергента используется ЦТАБ, было получено 4 ложноотрицательных результата из 100, тогда как применение коммерческих наборов позволяло избежать получения ложноотрицательных результатов ПЦР. Помимо этого применение некоммерческого способа выделения растительной ДНК, в котором качестве детергента используется ЦТАБ, наиболее трудоемкий и занимал не менее 6 часов. В тоже время выделение ДНК с использованием наборов реагентов «Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов» и «ПРОБА–ЦТАБ» позволяло сократить время анализа до 2 и 2,5 часов, соответственно.

Выводы: сравнительный анализ выбранных методов экстракции растительной ДНК из проб продуктов питания, показал, что для проведения ПЦР с целью видовой идентификации тканей растительного происхождения

наиболее пригодны метод с использованием готовых наборов реагентов «Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов», (ЗАО Синтол, Москва) и «ПРОБА–ЦТАБ» (ООО «НПО ДНК–Технология», Москва).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейнера, Р. Скотта, Ф. Армиджда, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. 124 с.
2. Сомма, М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 4. Выделение и очистка ДНК / Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. 20 с.
3. Cheng, Y-J. An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species / Y-J. Cheng, W-W. Guo, H-L. Yi et al. // Plant Mol Biol Rep. 2003. V. 21. P. 177a–g.
4. Edwards, K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis / K. Edwards, C. Johnstone, C.A. Thomson // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 1349.
5. Ivanova, N.V. Semi-automated, Membrane-Based Protocol for DNA Isolation from Plants / N.V. Ivanova, A.J. Fazekas, P.D.N. Hebert // Plant Mol Biol Rep. 2008. V. 26. P. 186-198.
6. Poms, R.E. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat / R.E. Poms, J. Glossl, H. Foissy // European Food Research and Technology. 2001. V. 213. P. 361-365.
7. Rossen, L. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions / L. Rossen, P. Norskov, K. Holmstrom, O.F. Rasmussen // Int. J. Food Microbiol. 1992. № 17. P. 37-45.
8. Woolfe, M. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud / M. Woolfe, S. Promrose // Trends Biotechnol. 2004. № 22. P. 222-227.

METHOD OF VEGETATIVE DNA ISOLATION FROM PLANTS AND FOOD STUFFS ON THEIR BASIS

© 2010 L.A. Ostroumov, A.Yu. Prosekov, A.N. Arhipov, O.V. Mudrikova
Kemerovo Technological Institute of Food-processing Industry

DNA isolation from many kinds of plants is considered a difficult problem because of high concentration of secondary metabolites, such as polysaccharides and polyphenolums. Vegetative DNA isolation from the food stuffs, received on their basis, is a problem even more difficult. It is connected with the presence of proteins, fats and inhibitory agents in assays. There are some procedures for the decision of this problem, also commercial panels are developed. In the research we have lead analysis of existing procedures of DNA isolation from plants and isolation the vegetative DNA from food stuffs on their basis.

Key words: *isolation of DNA, plant, food stuffs*

Lev Ostroumov, Doctor of Technical Sciences, Professor at the Milk and Milk Stuff Department. E-mail: ostroumov@mail.ru
Alexander Prosekov, Doctor of Technical Sciences, Head of the Bionanotechnologies Department. E-mail: apersekov@rambler.ru
Alexander Arhipov, Candidate of Technical Sciences, Doctorant at the Milk and Milk Stuff Department. E-mail: arhipov@yandex.ru
Olga Mudrikova, Post-graduate Student. E-mail: mudrikovaov@mail.ru