

УДК 578.5

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ МЕТОДИКИ ЭКСТРАКЦИИ
ДНК БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE***

Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Мастиленко А.В., кандидат биологических наук, доцент,
8(8422) 55-95-47, mav0608@yandex.ru

Сульдина Е.В., ассистент, 8(8422) 55-95-47,
e.suldina2006@yandex.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, нуклеиновые кислоты, бактериофаги, оптимальная методика, экстракция.

В статье представлены результаты исследований по подбору оптимальная методика экстракции фаговых геномов, при использовании которой фиксировался максимальный выход нуклеиновых кислот с минимальным эффектом деградации и отсутствием необратимой сорбции. Установлено, что использование методики экстракции на магнитных частицах и фенольно-хлороформная экстракция приводит к выходу матричной НК с максимальной чистотой. Однако коэффициент поглощения НК для методики с магнитными частицами значительно выше таковой у фенольно-хлороформной экстракции (в 1,07-3,91 раза).

Бактерии вида *Pseudomonas syringae* являются причиной заболеваний всех культивируемых человеком

растений, а также дикорастущих растений. Среди симптомов, которые они вызывают, различают опухолевые новообразования, гниение, прекращение роста и гибель части растения без загнивания, хлороз, некроз [1-3].

Эффективность использования бактериофагов в сельском хозяйстве для профилактики заболеваний и снижения порчи продуктов растениеводства, вызванной различными бактериями, вероятно, изучена менее всего. Зная биологические особенности возбудителя, можно создать экологически безопасный биологический препарат на основе специфических бактериофагов, который позволит проводить деконтаминацию растений на разных стадиях (посевной материал, в период вегетации и при хранении) [4].

Цель исследований - получение препаратов нуклеиновых кислот бактериофагов *Pseudomonas syringae* с максимальным выходом и чистотой.

Материалы и методы.

В настоящее время существует несколько методов лизиса клеточных стенок бактериальных культур и вирусных капсидов. В основе одних из них лежит щелочной лизис, других - действие ферментов протеиназ и т.п. Также на современном рынке реагентов для молекулярной биологии представлено множество готовых коммерческих наборов для совместной экстракции ДНК/РНК. Однако для большинства молекулярно генетических исследований предъявляются упрощенные требования к качеству препарата нуклеиновых кислот.

Объектами исследований были 8 бактериофагов, выделенных и селекционированных авторами, специфичных для бактерий *Pseudomonas syringae*.

Таблица 1 – Характеристика объектов исследований для выделения бактериофагов и параметры их культивирования

№ №	Название бактериофага	Индикаторная культура	Соотношение фаг/индикаторная культура/мл	Наименование объекта из которого был выделен бактериофаг	Местонахождение объекта выделения	Метод Отто
1	Ps.s-1 УлГАУ	<i>B-10917</i>	1:1/ 0, 2 мл: 0,2 мл	Огурец	Ульяновская область, Чердаклинский район п. Мирный	++
2	Ps.s-7 УлГАУ	<i>Ps.-3</i>	1:1/ 0, 2 мл: 0,2 мл	Почва	Самарская область, Кошкинский район с. Большая Константиновка	+
3	Ps.s-8 УлГАУ	<i>Ps.-3</i>	1:1/ 0, 2 мл: 0,2 мл	Почва	Ульяновская область, Кузоватовский район с. Еделево	+++
4	Ps.s-13 УлГАУ	<i>Ps.-3</i>	1:2/ 0, 2 мл: 0,4 мл	Почва	Самарская область, Елховский район с. Березовка	+
5	Ps.s-15 УлГАУ	<i>Ps.-3</i>	1:1/ 0, 2 мл: 0,2 мл	Почва	Оренбургская область, Первомайский район п. Маевка	++
6	Ps.s-27 УлГАУ	<i>Ps.-3,</i>	1:1/ 0, 2 мл: 0,2 мл	Почва	Ульяновская область Ульяновский район п. Ундоры	+
7	Ps.s-30 УлГАУ	<i>B-10917</i>	1:1/ 0, 2 мл: 0,2 мл	Сточные воды	Ульяновская область Сурский район с. Кивать	+
8	Ps.s-77 УлГАУ	<i>B-10917</i>	1:1/ 0,3 мл: 0,3 мл	Почва	Саратовская область Ртишевский район с. Макарово	+

Примечание:

- отсутствие лизиса;

+ лизис по ходу стекания капли;

++ лизис по ходу стекания капли и наличие стерильных пятен;

+++ наличие стерильного пятна и зон лизиса

Для сравнения выхода полученной НК и её качества нами были использованы следующие методики экстракции:

1) органическая экстракция (с помощью фенола, хлороформа) с последующим осаждением ДНК/РНК спиртами и растворением в воде и ТЕ-буфере;

2) дифференциальная сорбция нуклеиновых кислот на твердом носителе - силикагеле с повышенным отрицательным зарядом, отмывка сорбента с ДНК/РНК, растворение сорбированных нуклеиновых кислот в деионизованной воде или ТЕ-буфере. Выделение НК по методике п.1. Для экстракции ДНК использовали коммерческий набор «Проба ГС» (НПФ «ДНК-Технология», Россия);

3) дифференциальная сорбция на нуклеиновых кислот на магнитных частицах, с последующей отмывкой и элюцией ДНК/РНК. Выделение НК по методике п.1. Для экстракции ДНК использовали коммерческий набор «УниМаг» («ВекторБест», Россия) [5-8].

Исследованиям на данном этапе были подвергнуты все 8 выделенных и селекционированных бактериофагов с целью получения максимально достоверных результатов исследований.

Результаты исследований и обсуждение. Используя вышеперечисленные методики, было проведено экстрагирование нуклеиновых кислот исследуемых бактериофагов. Далее после получения раствора нуклеиновых кислот (НК) в трис-ЭДТА буфере, было проведено спектрофотометрическое измерение оптической плотности каждой пробы при 260 нм, 280 нм и 230 нм с использованием спектрофотометра BioSpectrometer kinetic (Eppendorf). При этом были использованы расчеты A_{260}/A_{230} , позволяющие вычесть примеси, не относящиеся к

поглощению светового потока нуклеиновыми кислотами. Для определения чистоты НК использовались расчеты A_{260}/A_{280} , при этом образцы считались с содержанием достаточно чистой для использования в молекулярно-генетических исследованиях НК при коэффициенте не менее 1,8. Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 2-4 и на рисунке 1.

Таблица 2 – Расчет коэффициента чистоты НК, полученных с использованием фенола-хлороформа

№ п/п	Наименование бактериофага	k поглощения			
		260	280	260/280	260/230
1	Ps.s-1 УлГАУ	1,650	0,882	1,87	0,58
2	Ps.s-7 УлГАУ	2,010	1,031	1,95	0,89
3	Ps.s-8 УлГАУ	1,871	1,215	1,54	0,94
4	Ps.s-13 УлГАУ	1,980	1,059	1,87	0,78
5	Ps.s-15 УлГАУ	3,200	1,758	1,82	1,02
6	Ps.s-27 УлГАУ	3,921	2,253	1,74	1,4
7	Ps.s-30 УлГАУ	4,500	2,848	1,58	0,87
8	Ps.s-77 УлГАУ	3,254	1,972	1,65	0,95

Таблица 3 – Расчет коэффициента чистоты НК, полученных с использованием магнитных частиц

№ п/п	Наименование бактериофага	k поглощения			
		260	280	260/280	260/230
1	Ps.s-1 УлГАУ	3,658	1,850	1,98	0,75
2	Ps.s-7 УлГАУ	3,200	1,750	1,83	0,68
3	Ps.s-8 УлГАУ	4,900	2,500	1,96	0,58
4	Ps.s-13 УлГАУ	4,200	2,875	1,46	0,81
5	Ps.s-15 УлГАУ	12,500	6,800	1,84	0,9
6	Ps.s-27 УлГАУ	7,300	4,200	1,74	0,84
7	Ps.s-30 УлГАУ	4,800	4,000	1,20	0,79
8	Ps.s-77 УлГАУ	7,100	3,821	1,86	0,74

Таблица 4 – Расчет коэффициента чистоты НК, полученных с использованием сорбента силикагеля

№ п/п	Наименование бактериофага	k поглощения			
		260	280	260/280	260/230
1	Ps.s-1 УЛГАУ	2,580	1,380	1,87	1,5
2	Ps.s-7 УЛГАУ	3,010	1,750	1,58	1,24
3	Ps.s-8 УЛГАУ	3,580	2,500	1,98	1,74
4	Ps.s-13 УЛГАУ	2,980	2,875	1,85	1,32
5	Ps.s-15 УЛГАУ	5,600	6,800	1,74	1,41
6	Ps.s-27 УЛГАУ	4,200	4,200	1,69	1,9
7	Ps.s-30 УЛГАУ	2,500	4,000	1,87	0,89
8	Ps.s-77 УЛГАУ	3,900	3,821	1,88	0,98

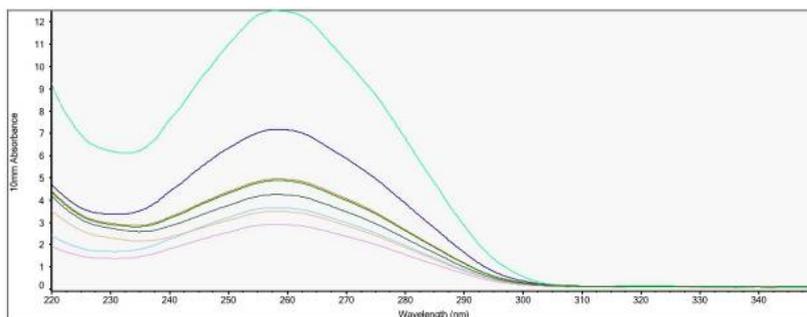


Рисунок 1 - Графики спектра поглощения препаратов НК, полученных с использованием магнитных частиц.

Заключение. В результате проведенных исследований и расчетов коэффициента чистоты НК было сделано заключение, что использование методики экстракции на магнитных частицах и фенольно-хлороформная экстракция приводит к выходу матричной НК с максимальной чистотой. Однако коэффициент поглощения НК для методики с

магнитными частицами значительно выше таковой у фенольно-хлороформной экстракции (в 1,07-3,91 раза). Определена оптимальная методика выделения фаговых геномов, исходя из эффективности чистоты и количества НК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области РФ в рамках научного проекта № 19-44-730014.

Библиографический список:

1. Morris, C.E. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France / C.E. Morris // *Phytopathology*. -2000. - Vol. 90. - P. 636-646.
2. Patyka, V.P. Phytopathogenic bacteria in contemporary agriculture / V.P. Patyka // *Мікробіологічний журнал*. – 2016. – №. 78 (6). – P. 71-83.
3. Kosakoniacowanii as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.) / K. Krzysztof., B.F. Natasza // *European Journal of Plant Pathology*. – 2020. – Vol. 157. – №. 1. – С. 173-183.
4. Rudi, K. Overview of DNA purification for nucleic acid-based diagnostics from environmental and clinical samples / K. Rudi, K.S. Jakobsen K.S. // *Methods in Molecular Biology*. - 2006. - Vol. 345. - P. 23-35. DOI: 10.1385/1-59745-143-6:23.
5. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels / D.D. Moore, J. Chory, R.K. Ribaud // *Current Protocols in Immunology*. - 1993. - Vol. 8, is. 1. - P. 10.5.1-10.5.12.
6. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures / E. Moore, A. Arnscheidt, A. Krüger

et al. // Molecular Microbial Ecology Manual, 2nd Ed. – 2004. - Vol. 1. - P. 3-18.

7. Tan, S.C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present / S.C. Tan, B.C. Yiap // J. Biomed. Biotechnol. - 2009. - Vol. 2009. – P. 574398. DOI: 10.1155/2009/574398

8. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (Обзор) / О.С. Антонова, Н.А. Корнева, Ю.В. Белов и др.// Научное приборостроение. - 2010. - Т. 20. - № 1. - С. 3-9.

DETERMINATION OF OPTIMAL PROCEDURE FOR EXTRACTION OF BACTERIOPHAGES PSEUDOMONAS SYRINGAE DNA

**Feoktistova N.A., Mastilenko A.V., Suldina E.V.,
Vasiliev D.A.**

Key words: *Pseudomonas syringae*, nucleic acids, bacteriophages, optimal procedure, extraction.

The article presents the results of research on the selection of an optimal method for extracting phage genomes, the use of which recorded the maximum yield of nucleic acids with a minimum degradation effect and the absence of irreversible sorption. It was found that the use of the magnetic particle extraction technique and phenol-chloroform extraction leads to the output of the matrix HC with maximum purity. However, the absorption coefficient of NC for the magnetic particle procedure is significantly higher than that for phenol-chloroform extraction (1.07-3.91 times).