

УДК 579.66

Метод экстракции ДНК из широкого спектра объектов с помощью обработки солями аммония

© 2020 К.В. СИДОРУК^{1*}, Е.И. ЛЕВИТИН¹, Б.В. СВИРИДОВ¹, О.В. ПИКСАСОВА¹,
Т.Е. ШУСТИКОВА^{1**}

¹ Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, 117545

*e-mail: k_sidoruk@mail.ru

**e-mail: igenetic@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.11.2020 г.

После доработки 24.11.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

Современные задачи биотехнологии и биоинформатики требуют наличия простых, быстрых и эффективных методик выделения ДНК из широкого спектра объектов. Ключевым и зачастую лимитирующим этапом для большинства методов является разрушение прочных клеточных стенок и последующая экстракция ДНК из дезинтегрированных клеток.

Нами разработан новый подход к выделению ДНК из организмов с прочными клеточными стенками, который включает следующие этапы: обработку клеток или образцов ткани раствором ацетата аммония и последующий лизис клеток в низкосолеваемом буфере с добавлением SDS. Дальнейшая очистка ДНК проводится по стандартным методикам. Данный подход позволяет получать большие количества высокомолекулярной нативной ДНК из клеток бактерий, аскомицетов, дрожжей, а также крови млекопитающих и удобен при быстром анализе природных микробных изолятов и для выделения плазмид при скринировании двугибридных библиотек.

Ключевые слова: быстрый метод выделения ДНК, обработка солями аммония, осмотическое разрушение клеток.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-98-106

Современные методы требуют наличия простых и надёжных протоколов выделения ДНК из исследуемых организмов. Разработано множество методов, обеспечивающих получение ДНК из широкого круга организмов с высоким выходом [1, 2]. После разрушения клеточной стенки ДНК экстрагируется и подвергается очистке от белков, РНК, полисахаридов и нерастворимых компонентов клеток. Методы очистки ДНК универсальны для различных организмов, в то время как разрушение клеточной стенки может потребовать специфических подходов из-за большого разнообразия строения и состава клеточных оболочек.

Разрушение клеточной стенки может быть осуществлено с помощью механического,

ферментативного или химического воздействия [1, 2].

Механическая дезинтеграция может быть выполнена растиранием клеток в ступке с жидким азотом или перемалыванием с помощью стеклянных шариков [1], обработкой ультразвуком или использованием нескольких циклов замораживания–оттаивания [3–5]. Процедуры механического разрушения клеточной стенки универсальны и, как правило, эффективны, однако в случае большого количества разнообразных образцов они требуют существенных временных затрат или осуществляется на специфическом оборудовании, что препятствует автоматизации процесса. Кроме того, существует опасность разрушения ДНК под

Список сокращений: УЗ — ультразвук, SDS — додецилсульфат натрия, HF — плавиковая кислота, TE-буфер — раствор ЭДТА в Трис-буфере, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ВКПМ — всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, ВКМ — всероссийская коллекция микроорганизмов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, рРНК — рибосомная РНК, GuHCl — гуанидингидрохлорид, СССР — карбонилцианид-м-хлорфенилгидразона, УФ — ультрафиолетовое излучение

действием УЗ, что не позволит выделить хромосомы с высокой молекулярной массой [1, 6].

С учётом вышеперечисленного, ферментативное разрушение клеточной стенки предпочтительнее. Для широкого круга организмов применяются ферменты, такие как яичный лизоцим, стафилизин, литиказа или комбинации литических ферментов, например, метаполизим. [1, 7–9]. Однако, практика показывает, что в ряде случаев они недостаточно эффективны.

Химическое разрушение клеток используют независимо или в сочетании с механическими или ферментативными методами. Известно использование горячего раствора SDS или сильных хаотропных агентов, таких как соли гуанидина. Такие методы имеют широкий диапазон применимости и могут быть адаптированы как для отдельных микроорганизмов, так и для сложных объектов, например почвенных микробных сообществ [10, 11]. Описано расщепление полисахаридных цепей клеточной стенки небольшими дозами агрессивных реагентов, таких как HF [12]. При этом, однако, требуется предельная точность при постановке реакции, что затрудняет использование этого метода в качестве рутинной методики. Простые модификации протоколов химической деградациии клеточной оболочки не привели к увеличению их эффективности, в то время как их комбинации с другими методами слишком сложны и времязатратны. В связи с этим разработка простых и эффективных протоколов выделения ДНК, позволяющих сэкономить время и обеспечить хороший выход высокомолекулярной ДНК из широкого спектра образцов бактерий и дрожжей, является актуальной задачей.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы, среды, реактивы. Штаммы дрожжей и бактерий, использованных для разработки предлагаемого метода, указаны в табл. 1. Питательные среды LB или YPD были приготовлены на основе пептона, дрожжевого экстракта, сахарозы («Диаэм», Россия) и NaCl («РеаХим», Россия) в соответствии с общепринятыми протоколами [1]. Также были использованы коммерческие готовые среды BH (BD, США), MRS (Merck, Германия). Штаммы поддерживали на агаризованной твердой среде. Каждую культуру очищали путем отбора отдельной колонии с истощающего штриха на твердой среде. Для приготовления твердых сред использовали агар PCA (Bio-Rad, США).

В процедуре экстракции ДНК использовали ферменты литиказу и лизоцим (Fermentas, Литва), фенол (AppliChem, Германия), хлороформ,

изопропанол, («РеаХим»), ацетат аммония («Диаэм»), TE-буфер (AppliChem). Другие необходимые буферы готовили с использованием сорбитола, ЭДТА, SDS, ТрисHCl (Serva, Германия). Смесь фенол-хлороформ была приготовлена в соответствии с классическим протоколом [1].

При исследовании влияния различных солей на выход ДНК пропионат и изобутират аммония получали реакцией аммиака («СигмаТек», Россия) с пропионовой кислотой и изомасляной кислотой (Serva), соответственно. Хлорид и ацетат диметиламина получали реакцией диметиламина с соляной кислотой и уксусной кислотой (Serva), соответственно. Соли в чистом виде получали перекристаллизацией. Остальные использованные в работе соли производства «РеаХим».

Подготовка образцов для выделения ДНК.

Предварительную ночную культуру получали путем инокуляции отдельных дрожжевых или бактериальных колоний в жидкую среду. Затем клетки засеивали при концентрации примерно 10^5 клеток/мл в 3–5 мл жидкой среды и культивировали в условиях, указанных в табл. 1, на роторном шейкере¹ (InforseHT Multitron, США). Клетки собирали центрифугированием (Eppendorf MiniSpin, Германия)² при 12 000 g в течение 5 мин.

Образец венозной крови барана отбирали, как описано [1], и добавляли ЭДТА в качестве антикоагулянта до конечной концентрации 2 мМ.

Выделение ДНК с помощью ферментативного разрушения клеточной стенки.

Дрожжевые или бактериальные клетки, собранные из ранней стационарной фазы культуры (10^8 и 10^9 клеток/мл, соответственно), ресуспендировали в 0,5 мл осмотического защитного раствора (1,2 М сорбитола, 50 мМ ТрисHCl pH 8,0, 20 мМ ЭДТА). Добавляли свежий раствор литиказы до конечной концентрации 2 мг/мл для дрожжей или лизоцим до 20 мг/мл для бактерий. Бактериальные или дрожжевые клетки инкубировали в течение 1 ч при осторожном перемешивании и слабом встряхивании на роторном шейкере при 28 °С. Затем добавляли 10%-ный раствор SDS до конечной концентрации 1% и перемешивали образец встряхиванием. Последующую очистку ДНК путем экстракции фенолом проводили, как описано [1]. В качестве альтернативы фенольной депротенинизации на последней стадии к смеси

¹ Здесь и далее культивирование культур проводили на роторном шейкере InforseHT Multitron при указанных условиях.

² Здесь и далее центрифугирование проводилось на центрифуге Eppendorf MiniSpin при 12 000 g в течении 5 мин, если не указано иначе.

Штаммы дрожжей и бактерий, использованных для разработки метода**Yeast and bacterial strains used to develop the method**

Организм	Коллекционный номер	Питательная среда, температура, время культивирования, стадия роста	Источник	
<i>Synechocystis sp.</i>	PCC6803	BG 11, 26 °С 120ч, стац.	Коллекция микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ	
<i>Pichia pastoris</i>	Y-727	YPD, 30 °С, 48ч, стац.		
<i>Pichia (Hansenula) anomala</i>	Y-382	YPD 30 °С, 48ч, стац.		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Y-10	YPD, 30 °С, 48ч, стац.		
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8	Ac-1728	LB, 30 °С, 48ч, стац.		
<i>Escherichia coli</i> TG1	B-6195	LB, 57 °С, 20ч, стац.		
<i>Lactococcus sp.</i>	B-3427	MRS, 30 °С 48ч, стац.		ВКПМ [13]
<i>Streptococcus sp.</i>	B-1568	MRS, 30 °С, 48ч, стац.		
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	B-3715	ВН, 30 °С, 20ч, лог.		
<i>Bacillus subtilis</i>	B-2335	LB, 37 °С, 16ч, лог.		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	B-6306	LB, 30 °С, 20ч, лог.		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y-382	YPD, 30 °С, 48ч, стац.	ВКМ [14] Philip James [15]	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y-502S	YPD, 30 °С, 48ч, стац.		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PJ69-A4	YPD, 30 °С, 48ч, стац.		

может быть добавлен ацетат аммония до конечной концентрации 2,5–3 М для осаждения загрязняющих белков из образца [1, 16].

Выделение ДНК с помощью перетирания в жидком азоте. Образец (примерно 1 г клеток), собранный из жидкой культуры, замораживали жидким азотом, растирали до порошка с помощью ступки и пестика и немедленно погружали в 3-кратный объем буфера для экстракции (500 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА, 20 мМ ТрисHCl, pH 8,0, SDS до 1%). Затем образец экстрагировали смесью фенол-хлороформ или осаждали при меси ацетатом аммония, как указано выше.

Выделение ДНК с помощью стеклянных шариков. $5 \cdot 10^8$ дрожжевых клеток ресуспендировали в 300 мкл раствора (1% SDS, 150 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА, 20 мМ ТрисHCl pH 8,0). Добавляли 200 мкл смеси фенол-хлороформ и 50 мкл стеклянных шариков 425–600 мкм (Sigma Aldrich, США). Пробирку встряхивали в течение 2 мин на гомогенизаторе (Scientific Industries, Disruption Genie, США) и центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин. Супернатант переносили в другую пробирку и добавляли 0,6 объема изопропанола для преципитации ДНК.

Основной протокол выделения ДНК из бактерий. 10–50 мг клеток, собранных центрифугированием жидкой культуры или извлеченных

инокуляционной петлей с твердой среды, ресуспендировали в 200 мкл 6 М ацетата аммония; инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Осаждали клетки центрифугированием и ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера (1% SDS, 10 мМ TrisHCl, 20 мМ ЭДТА, pH 8)³, помещали на водяную баню и инкубировали при 65 °С в течение 10 мин. К препарату добавляли 200 мкл 7,5 М раствора ацетата аммония и перемешивали, переворачивая пробирку. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, добавляли 100 мкл хлороформа, перемешивали на шейкере (Heidolph ReaxTop, Германия) 1–2 сек и центрифугировали. Супернатант переносили в новую пробирку, осаждали ДНК добавлением 600 мкл изопропилового спирта; инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и собирали осадок ДНК центрифугированием в течение 10 мин. Осадок дважды промывали 70%-ным этанолом, подсушивали и растворяли в 50–100 мкл деионизованной воды или буфера TE. Типичный выход ДНК составлял 2–10 мкг из 50 мг влажной биомассы. Для некоторых бактерий требуется индивидуальный подбор концентраций ацетата аммония и фазы роста культур. Например, для *Corynebacterium glutamicum* концентрация ацетата аммония составляла 0,5 М, а для *Rhodococcus rhodochrous* — 7,5 М.

³ Здесь и далее состав лизирующего буфера не меняется.

Основной протокол выделения ДНК из дрожжей. Осажденные 10–50 мг клеток дрожжей на первом этапе ресуспендировали в 2 М ацетате аммония. Дальнейший протокол не отличается от основного протокола выделения ДНК из бактерий. Выход дрожжевой ДНК составлял 1–5 мкг из 50 мг влажной биомассы.

Упрощенный протокол для дрожжевых и бактериальных культур. Собирали 1 колонию с помощью инокуляционной петли и ресуспендировали в 60 мкл раствора ацетата аммония (4 М для дрожжей или 6 М для бактериальных культур); или смешивали 30 мкл жидкой культуры с 30 мкл раствора ацетата аммония (6 М для дрожжей или 10 М для бактериальных культур). Быстро разбавляли суспензию клеток избытком (500 мкл) лизирующего буфера. Инкубировали при 65 °С в течение 10 мин; добавляли 200 мкл 7,5 М ацетата аммония. Дальнейшую очистку проводили как описано в предыдущем протоколе. Выделенной таким образом ДНК хватает на постановку нескольких ПЦР.

Выделение ДНК из свежего или консервированного образца крови. Добавляли к образцу крови равный объем 10 М ацетата аммония; инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировали, отделяли супернатант, осадок ресуспендировали в 1 мл 5 М ацетата аммония, центрифугировали повторно. Ресуспендировали в 0,6 мл лизирующего раствора. Дальнейшую очистку проводили аналогично выделению ДНК из бактериальных культур. Этот же протокол можно использовать для культуры клеток млекопитающих.

ПЦР геномной ДНК. Для ПЦР использовали 20 нг геномной ДНК, 5 мкМ каждого праймера и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq («AmpliSens», Россия) в объеме 25 мкл. Скрининг большого количества штаммов проводили с использованием 1/100 от общего выделенного минипрепарата ДНК без оценки количества ДНК. Условия цикла были следующими: начальная стадия денатурации при 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов, каждый из которых состоит из 95 °С в течение 30 сек, 58 °С в течение 30 сек и 72 °С в течение 1 мин, с окончательной элонгацией на 72 °С в течение 4 мин. Для амплификации бактериального фрагмента длиной 1,5 т. п. н. из гена рибосомной субъединицы 16S использовали пару для консервативной области: 5'-agagtttgatcctggctcag-3' [17]; 5'-gggtacctgttacgactt-3' [18]. Амплификацию фрагментов однокопийных генов *Saccharomyces*

cerevisiae SUP35 (хромосома IV) и TRX2 (хромосома VII) проводили с уникальным набором праймеров. Фрагмент SUP35 длиной 1,3 т. п. н. амплифицировали с праймеров 5'-gaatccccatggatgttgggtgtaaagatcacg-3' и 5'-gggaatcggaatttaacaattttacc-3'. Фрагмент промотора TRX2 размером 0,5 т. п. н. амплифицировали с праймеров 5'-gggaattcaacatccagacttttacgggt-3' и 5'-ccggatccgatgtgtatttaaagatcgt-3'.

Манипуляции с ДНК. Необходимые манипуляции с ДНК, такие как электрофорез ДНК в агарозном геле или обработку ферментами рестрикции, проводили в соответствии со стандартными методиками [1]. Количество и качество ДНК в препарате оценивали измерением соотношения поглощения УФ при длинах волн 260/280 или путем сравнения с маркером ДНК на агарозном геле с помощью программы Totallab Quant 2.2.0. Трансформацию дрожжей с ацетатом лития (Sigma Aldrich, США) выполняли классическим способом [1]. Клетки *E.coli* трансформировали с использованием протокола SEM [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточные стенки грамположительной бактерии *Rhodococcus rhodochrous* M8 относительно устойчивы к действию лизоцима, и их разрушения не происходит в присутствии SDS или GuHCl. В тоже время было обнаружено, что предварительная обработка 7,5 М раствором формиата аммония увеличивает выход ДНК при последующем добавлении SDS. На основе наблюдаемого явления был разработан новый подход к выделению ДНК, основанный на осмотическом разрушении клеток при двукратной обработке солями аммония с концентрацией от 0,5 М до 7,5 М, которая подбирается в зависимости от объекта.

Исследование влияния различных солей на выход ДНК. Эффективность выделения ДНК при разрушении клеток в соответствии с разработанным протоколом определяли с использованием различных солей аммония: хлорида, фторида, сульфата, карбоната, гидрокарбоната, изотиоцианата, формиата, ацетата, пропионата, изобутирата, а также ацетата и хлорида диметиламина, фторида калия и ацетата натрия. Результаты представлены на рис. 1.

Живые клетки поздней стационарной фазы жидкой культуры *Rh. rhodochrous* были ресуспендированы в растворах солей для предварительной обработки. Затем клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в лизирующем растворе. Концентрация растворов для предварительной

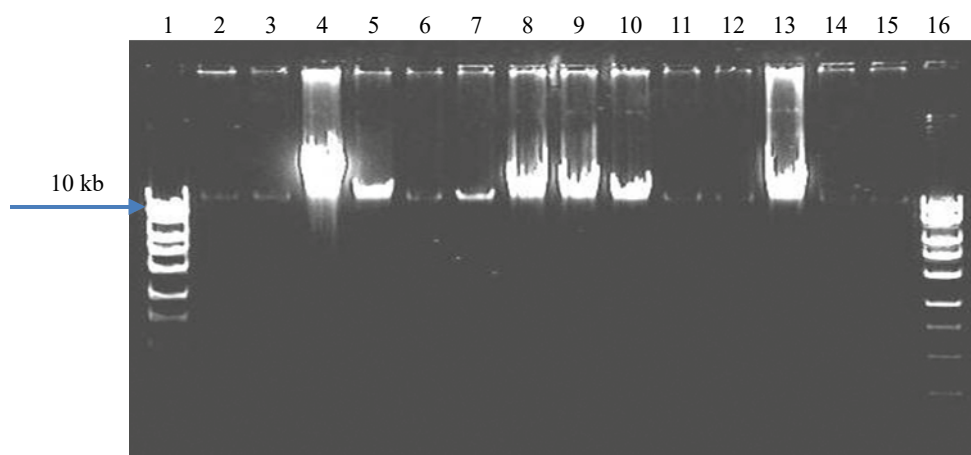


Рис. 1. Гель-электрофорез образцов ДНК, выделенных из *Rhodococcus rhodochrous M8* с помощью обработки различными солями. На форе́з нанесено количество ДНК, соответствующее 10^8 клеток стационарной жидкой культуры. **Дорожки:** 1 — DNA MassRuler DNA Ladder mix, (Fermentas #SM0393) 10 мкл; 2 — вода (контроль); 3 — хлорид аммония (0 нг ДНК); 4 — фторид аммония (190 ± 20 нг ДНК); 5 — изотиоцианат аммония (70 ± 10 нг ДНК); 6 — сульфат аммония (2.5 M) (10 ± 5 нг ДНК); 7 — гидрокарбонат аммония (2.0 M) (30 ± 5 нг ДНК); 8 — формиат аммония (160 ± 15 нг ДНК); 9 — ацетат аммония (140 ± 15 нг ДНК); 10 — изопропионат аммония (90 ± 10 нг ДНК); 11 — изобутират аммония (0 нг ДНК); 12 — хлорид диметиламина (0 нг ДНК); 13 — ацетат диметиламина (170 ± 20 нг ДНК); 14 — фторид калия; 15 — ацетат натрия (4.5 M) (0 нг ДНК).

Fig.1. Gel electrophoresis of DNA samples isolated from *Rhodococcus rhodochrous M8* by treatment with various salts. The amount of DNA corresponding to 10^8 cells of a stationary liquid culture is applied to the gel

Tracks: 1 — DNA MassRuler DNA Ladder mix, (Fermentas #SM0393) 10 mkl; 2 — water (as a control); 3 — ammonium chloride (0 ng of DNA); 4 — ammonium fluoride (190 ± 20 ng of DNA); 5 — ammonium isothiocyanate (70 ± 10 ng of DNA); 6 — ammonium sulphate (2.5 M) (10 ± 5 ng of DNA); 7 — ammonium bicarbonate (2.0 M) (30 ± 5 ng of DNA); 8 — ammonium formate (160 ± 15 ng of DNA); 9 — ammonium acetate (140 ± 15 ng of DNA); 10 — ammonium isopropionate (90 ± 10 ng of DNA); 11 — ammonium isobutyrate (0 ng of DNA); 12 — dimethylamine chloride (0 ng DNA); 13 — dimethylamine acetate (170 ± 20 ng of DNA); 14 — potassium fluoride (0 ng of DNA); 15 — sodium acetate (4.5 M) (0 ng of DNA).

обработки была 5 M, если не указано иначе. В случае, если раствор соли имел низкий pH, его доводили до pH 7,5 аммиаком.

В случае использования солей сильных кислот или солей натрия и калия, высвобождения ДНК не происходило, и наблюдалось только в тех случаях, когда соли были образованы ионами аммония или диметиламина, а в качестве аниона выступали ионы кислот слабой и средней силы.

Наибольший выход ДНК был получен при использовании фторида, формиата, ацетата аммония и ацетата диметиламина (4, 8, 9, 13 дорожки соответственно). Ацетат диметиламина в дальнейшем не использовали в связи с его малой доступностью. Концентрацию этих трех солей аммония подбирали для двух модельных организмов: *Rhodococcus rhodochrous* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-382. Оптимальные концентрации солей для этих видов различались (таблица 2).

Для *Rh. rhodochrous* наилучшие показатели наблюдались при использовании 6 M солей, для *S. cerevisiae* более эффективной оказалась 4 M концентрация. Мы остановили свой выбор на ацетате аммония, т.к. он является самым доступным из всех исследованных соединений и работает в наиболее широком диапазоне концентраций из всех трёх

проверенных соединений. При расширении области применения протокола на новые объекты, мы обнаружили, что для дрожжей-метилотрофов наибольший выход ДНК обеспечивает 2 M, а для *Corynebacterium glutamicum* — 0,5 M ацетат аммония. Таким образом, при работе с широким спектром микроорганизмов необходимо подбирать концентрацию соли для каждого конкретного объекта.

Возможные механизмы

Дополнительные эксперименты показали, что использование ацетата аммония при выделении ДНК не эффективно в том случае, если культуры были предварительно обработаны агентами, разрушающими мембрану клеток (хлороформом, этанолом, 1% SDS, длительным замораживанием или циклами многократного замораживания — оттаивания). На основании этого мы предположили, что механизм данной процедуры заключается в осмотическом разрушении клеток, обработанных растворами солей высокой концентрации в среде с низким осмосом.

Известно, что в растворах аммоний может находиться в виде катиона аммония NH_4^+ и в виде незаряженной формы, как растворенный в воде аммиак NH_3 . В незаряженном виде молекулы аммиака

Сравнение эффективности обработки солями аммония

Comparison of the efficiency of treatment with ammonium salts

Концентрация соли аммония	Выход ДНК из 10 ⁸ клеток, нг	
	<i>S.cerevisiae</i> Y-382	<i>Rh. rhodochrous</i> M8 Ac-1728
Аммония ацетат		
0,5 М	30 ±7	0
1,0 М	140 ±15	30 ±8
2,0 М	230 ±25	70 ±10
4,0 М	240 ±25	130 ±15
6,0 М	240 ±25	150 ±16
8,0 М	140 ±15	170 ±20
10,0 М	60 ±10	160 ±20
Аммония формиат		
0,5 М	0	0
1,0 М	150 ±17	0
2,0 М	300±25	20 ±7
4,0 М	210 ±20	100 ±12
6,0 М	70 ±10	170 ±20
8,0 М	30 ±8	190 ±22
Аммония фторид		
0,5 М	0	0
1,0 М	20 ±8	0
2,0 М	150 ±20	110 ±10
4,0 М	10 ±5	150 ±15
6,0 М	0	10 ±5
8,0 М	0	0

способны пассивно диффундировать через мембрану клеток. Аналогично этому, карбоновые кислоты, будучи кислотами средней и малой силы, в водном растворе также могут диссоциировать на заряженные ионы или оставаться в виде незаряженных молекул, способных к диффузии через клеточную мембрану. Возможно, что при обработке культур ацетатом аммония, аммиак и уксусная кислота, образующиеся в результате диссоциации — ассоциации ацетата аммония, диффундируют через клеточные мембраны и создают высокое внутриклеточное осмотическое давление. Последующая обработка гипотоническим раствором приводит к разрыву клеточных стенок из-за высокой разницы в осмотическом давлении. Такой неспецифический перенос аммиака через плазматическую мембрану ранее обсуждался как для клеток млекопитающих, так и для бактерий [19–21]. Клетки и искусственные мембраны также считаются проницаемыми для неионизированных малых молекул органических кислот [20].

Для того, чтобы исключить активный транспорт ионов в клетку, культуру *Rh. rhodochrous* обрабатывали тремя разными соединениями, которые должны подавлять активный трансмембранный

транспорт: разобщителем окисления и фосфорилирования СССР, ингибитором дыхания — азидом натрия и ингибитором АТФ-синтазы — олигомицином. Клетки *Rh. rhodochrous* перед выделением ДНК ресуспендировали либо в растворе СССР в концентрации 50 мкМ, либо азида натрия (100 мкг/мл), либо олигомицина (50 мкг/мл). В раствор ацетата аммония и в лизирующий буфер также добавляли соответствующее соединение в указанной концентрации. Ни в одном случае не было выявлено значительного влияния обработки на эффективность выделения ДНК. Следовательно, активный транспорт ионов в клетку не имеет практического значения для выделения ДНК по разработанному протоколу, что подтверждает гипотезу о пассивной диффузии ацетата аммония в клетку.

Исследование пределов применимости метода. Чтобы определить пределы применимости разработанного подхода, он был использован для выделения ДНК из природных изолятов 16 видов бактерий, принадлежащих к разным родам из образцов коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ:

Сравнение эффективности различных методов выделения ДНК.

Comparison of the effectiveness of various methods of DNA isolation

Штамм	Номер	Механическое разрушение, нг ДНК	Ферментативный лизис, нг ДНК	Выделение ацетатом аммония, нг ДНК
<i>Synechocystis sp.</i>	PCC6803	70 ±10	40 ±5	170 ±15
<i>Rhodococcus rhodochrous M8</i>	Ac-1728	50 ±5	0	150 ±15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y-502S	50 ±5	130 ±15	80 ±10
<i>Pichia pastoris</i>	Y-727	60 ±5	100 ±10	70 ±10
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Y-10	60 ±5	80 ±10	120 ±10

Примечание. Сравнили количество ДНК, выделенное из 10⁸ клеток

Note. The amount of DNA extracted from 10⁸ cells

- грамположительные: *Bacillus megatherium* 17, *Bacillus mycoides* 31, *Bacillus thuringiensis* 33, *Bacillus subtilis* 2, *Streptococcus thermophilus* A6, *Micr. Rascus* 131, *Rhodococcus erythropolis* 119, *Leuconostoc mesenteroides* 117, *Lactobacillus caucasicus* 155, *Lactobacillus casei* 154, *Lactococcus acidophilus* 148, *Nocardia calcarea* 215
- грамотрицательные: *Citrobacter frandii* 61, *Erwinia caratovora* 172, *Flavobacterium sp.* 269, *Serratia marcescens* 208

Выделение проводилось по упрощенному протоколу (см. выше). Во всех случаях наблюдали достаточный для постановки нескольких ПЦР выход ДНК (100–200 нг), а амплификация фрагмента гена рНК была успешной.

Полученная разработанным методом ДНК пригодна не только для ПЦР-амплификации высококопийных генов рибосом бактерий, а также и для фрагментов однокопийных генов дрожжей (*S. cerevisiae* Y382) на большой (SUP35, ch IV) или маленькой (TRX2, ch VII) хромосоме. Это указывает на то, что в препарате присутствовали все фрагменты геномной ДНК дрожжей в независимости от их размера. В выделенных по предложенной методике препаратах ДНК не наблюдалось ее разрывов или дегградации. Таким образом, выделенная данным методом ДНК пригодна для рестрикции без дополнительной очистки.

С помощью разработанного метода было проведено выделение ДНК для полногеномного секвенирования. из ряда штаммов ВКПМ: *Geobacillus stearothermophilus* В-9581, *Pseudomonas sp.* В-13382, *Kluyveromyces marxianus* Y-206, *Bifidobacterium adolescentis* Ac-1243, *Ogataea polymorpha* Y-2584, *Pichia pastoris* Y-3494, *Corynebacterium glutamicum* В-3715, *Bacillus subtilis* В-1727, *Rhodococcus erythropolis* Ac-1661 и *Micrococcus luteus* В-2836.

Для геномного секвенирования выделение ДНК проводилось по основному протоколу для бактерий и дрожжей, но из большего объема культуры. После чего проводили дополнительную хроматографическую или фенольную очистку ДНК до достижения требуемых параметров качества. После всех дополнительных очисток количество ДНК составляло 5–15 нг.

Кроме того, мы проанализировали возможность выделения рекомбинантных плазмид с помощью принятой процедуры выделения ДНК из большого пула клонов, полученных в результате двугибридного скрининга дрожжей. Колонии отобранных клонов (около 200) собирали и выделяли из них ДНК с помощью предлагаемой здесь методики или с использованием протокола разрушения клеток стеклянными шариками (Sigma, 425–600 мкм) в качестве контроля. Затем полученные препараты ДНК трансформировали в *E.coli* С600 [1] с использованием протокола трансформации SEM [1]. Обычно дрожжевые колонии диаметром 1 мм давали достаточно ДНК для получения от 10³ до 10⁴ трансформантов *E.coli*, и используемый протокол был в 10 раз более эффективным по сравнению с методом выделения стеклянными шариками.

Естественной границей применимости метода является то, что в его основе лежит осмотический лизис, и, следовательно, он хорошо работает только на свежих клетках с неповрежденной мембраной. Если материал подвергался длительной заморозке или обработке детергентами или растворителями, данный метод использовать не следует.

По сравнению с двумя традиционными методами (измельчением в жидком азоте или ферментативной дегградацией клеточной стенки) выделение ДНК из ряда бактериальных и дрожжевых культур с помощью предлагаемого протокола столь же эффективно, но менее трудоёмко (таблица 3).

Предложенный метод прост в исполнении и применим к большому количеству образцов,

эффективен для бактерий, аскомицетов, дрожжей, а также крови млекопитающих и позволяет получать большие количества высокомолекулярной нативной ДНК. В отличие от некоторых традиционных методов [22, 23] он легче адаптируется к полевым экспериментам, поскольку не требует специального оборудования или реагентов, и в то же время протокол легко адаптировать к роботизированным методам выделения ДНК. Возможно предлагаемый метод сможет успешно заменить определенные протоколы выделения ДНК с использованием имеющихся в продаже наборов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИГенетика, Курчатовский геномный центр.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / D. Russell ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press. 2001. V.1, 2, 3.
2. Ausubel, F. *Short protocols in molecular biology* New York, N.Y: John Wiley and Sons, Inc. 1997.
3. Hughes, D.E. Nyborg W.L. Cell Disruption by Ultrasound. *Science*, 1962, 138, 108. doi: 10.1126/science.138.3537.108
4. Roh C., Villatte F., Kim B.G., Schmid R.D. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006, 134(2), 97–112. doi: 10.1385/abab:134.2:97.
5. Griffiths L.J., Anyim M., Doffman S.R. et al. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2006, 55(9), 1187–1191. doi: 10.1099/jmm.0.46510-0.
6. Elsner, H., Lindblad E., Ultrasonic degradation of DNA. *DNA* (Mary Ann Liebert, Inc.), 1989, 8(10), 697–701. doi: 10.1089/dna.1989.8.697.
7. Tighe S., Afshinnekoo E., Rock T.M., Genomic Methods and Microbiological Technologies for Profiling Novel and Extreme Environments for the Extreme Microbiome Project (XMP), *J. Biomol. Tech.*, 2017, 28(1), 31–39. doi: 10.7171/jbt.17-2801-004.
8. Şahin F., Kıyan M., Karasartova D., et al. A new method for the disruption of cell walls of gram-positive bacteria and mycobacteria on the point of nucleic acid extraction: sand method., *Mikrobiyol. Bul.*, 2016, 50(1), 34–43. doi: 10.5578/mb.10685
9. Murray J.M., Watson A.T., Carr A.M., Extraction of Chromosomal DNA from *Schizosaccharomyces pombe*, *Cold Spring Harb Protoc.*, 2016, 2016(5). doi: 10.1101/pdb.prot090985
10. Dyer D., Iandolo E., Rapid isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, 46(1), 283–285. doi: 10.1128/AEM.46.1.283-285.1983
11. Lippke J.A., Strzempko M.N., Raia F.F., et al., Isolation of intact high-molecular-weight DNA by using guanidine isothiocyanate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53(10), 2588–2589. doi: 10.1128/AEM.53.10.2588-2589.1987
12. Oshiro S., Katsura N., Kitada K., Gunge N., A simple method for extraction of DNA from fungi and yeasts with anhydrous hydrogen fluoride. *FEBS letters*, 1987, 220(2), 383–386. doi: 10.1016/0014-5793(87)80851-7.
13. Каталог ВКПМ. <http://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/>
14. Каталог ВКМ. <http://www.vkm.ru/rus/Catalogue.htm>
15. James P., Halladay J., Craig E., Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 1996, 144(4), 1425–1436.
16. Singh U.A., Kumari M., Iyengar S., Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol. Proced. Online.*, 2018, 20. doi: 10.1186/s12575-018-0077-6
17. Li B.J., Li H.L., Shi Y.X., Xie X.W., First Report of *Pseudomonas cichorii* Causing Leaf Spot of Vegetable Sponge Gourd in China. *Plant Dis.*, 2014, 98(1), 153. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0312-PDN
18. Riera-Ruiz C., Vargas J., Cedeño C. et al., First Report of *Burkholderia glumae* Causing Bacterial Panicle Blight on Rice in Ecuador. *Plant Dis.*, 2014, 98(7), 988. doi: 10.1094/PDIS-10-13-1024-PDN
19. Ritchie R., Gibson J., Permeability of ammonia and amines in *Rhodobacter sphaeroides* and *Bacillus firmus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, 258(2), 332–341. doi: 10.1016/0003-9861(87)90352-3
20. Klocke, R., Ritchie R., Gibson J., Permeability of ammonia and amines in *Rhodobacter sphaeroides* and *Bacillus firmus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, 258(2), 332–341. doi: 10.1016/0003-9861(87)90352-3
21. Andersson K., Rotman H., Forster R., Permeability of human erythrocytes to ammonia and weak acids. *Am J Physiol.*, 1972, 222(4), 1004–1013. doi: 10.1152/ajplegacy.1972.222.4.1004
22. Antonenko Y., Pohl P., Denisov G., Permeation of ammonia across bilayer lipid membranes studied by ammonium ion selective microelectrodes. *Biophys J.*, 1997, 72(5), 2187–2195. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78862-3
23. Dellaporta S., Wood J., Hicks B., A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep.*, 1983, 14(1), 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
24. Möller E., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H., A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20(22), 6115–6116. doi: 10.1093/nar/20.22.6115.

Extraction of DNA from a Wide Range of Objects by Treatment with Ammonium Salts

K.V. SIDORUK^{1*}, E.I. LEVITIN¹, B.V. SVIRIDOV¹, O.V. PIKSASOVA¹, and T.E. SHUSTIKOVA^{1**}

¹ State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the “Kurchatov Institute” National Research Center (NRC “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA), Moscow, 117545, Russia

*e-mail: k_sidoruk@mail.ru

**e-mail: igenetic@yandex.ru

Received November 5, 2020

Revised November 24, 2020

Accepted December 1, 2020

Abstract—Currently, simple, rapid, and efficient techniques for DNA isolation from a wide range of organisms are in demand in biotechnology and bioinformatics. A key (and often limiting) step is the cell wall disruption and subsequent DNA extraction from the disintegrated cells. We have developed a new approach to DNA isolation from organisms with robust cell walls. The protocol includes the following steps: treatment of cells or tissue samples with ammonium acetate followed by cell lysis in low-salt buffer with the addition of SDS. Further DNA extraction is carried out according to standard methods. This approach is efficient for high-molecular native DNA isolation from bacteria, ascomycetes, yeast, and mammalian blood; it is also useful for express analysis of environmental microbial isolates and for plasmid extraction for two-hybrid library screening.

Key words: express method for DNA isolation; ammonium salt treatment (в русских ключевых такой порядок), osmotic breakage of cells

Funding—This study was financially supported by the NRC “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA, Kurchatov Genomic Center.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-98-106