

УДК 58.088

ПРОСТОЙ И БЫСТРЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ГЕРБАРНЫХ ОБРАЗЦОВ ДОЛГОГО СРОКА ХРАНЕНИЯ*

© 2015 А.А. Криницына^{1**}, Т.В. Сизова², М.А. Заика¹,
А.С. Сперанская^{1,3}, А.П. Сухоруков¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва; факс: +7(495)939-4309,
электронная почта: krinitsina@mail.ru

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
119991 Москва, ул. Губкина, 3; факс: +7(499)132-8962

³ ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123 Москва,
ул. Новогиреевская, 3а; факс: +7(495)304-2209

Поступила в редакцию 06.07.15

После доработки 24.07.15

В статье описывается удобный метод выделения ДНК из сухих фрагментов растений, хранившихся в гербарных коллекциях в течение 50–90 лет и имеющих высокое содержание вторичных метаболитов. Описанная процедура выделения ДНК занимает не более двух часов, состоит из трех последовательных стадий (лизис, осаждение нуклеиновых кислот изопропиловым спиртом, очистка на магнитных сорбентах) и не требует применения высоколетучих веществ (фенола, хлороформа, жидкого азота). Предлагаемый метод выделения ДНК позволяет получать из фрагментов листьев сухих гербарных образцов весом ~30 мг препараты высокого качества с концентрацией ДНК до 4 мкг. Показана возможность использования полученной предлагаемым методом ДНК для амплификации с последующим секвенированием маркерных последовательностей ядерного и хлоропластного геномов (фрагментов генов 5S рРНК и *rbcL*) при проведении филогенетических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: выделение ДНК, гербарий, ПЦР, маркерные последовательности, 5S рРНК, *rbcL*.

В настоящее время для установления систематической принадлежности и родственных связей между различными группами растений наряду с анатомо-морфологическими признаками и изучением их эволюционной направленности активно используют нуклеотидные последовательности участков ядерного и хлоропластного геномов [1]. Вместе с филогенетическими исследованиями данные о строении маркерных последовательностей используются для паспортизации диких видов и сортов культурных растений [2–4]. Одним из важнейших источников, связанных с изучением биологического разнообразия растений, являются гербарные хранилища.

Принятые сокращения: MW – гербарий МГУ им. М.В. Ломоносова; МНА – гербарий Главного ботанического сада РАН; ЦТАБ – бромид цетилтриметиламмония; РVP40 – поливинилпирролидон, 40 кДа; п.н. – пара нуклеотидов.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-218, 04.10.2015.

** Адресат для корреспонденции.

По всему миру насчитывается не менее 3400 официально зарегистрированных гербариев, в которых находится ~350 млн образцов растений (New York Botanical Garden's Virtual Herbarium, <http://sweetgum.nybg.org/ih/>), собранных преимущественно в течение последних 200 лет. Сохранность гербарных образцов не всегда идеальна, что связано с особенностями сбора и сушки растений, а также методами обработки и хранения материала [5]. Кроме того, с течением времени как геномная, так и пластидная ДНК растений разрушается [6], что существенно затрудняет использование старых образцов для секвенирования нуклеотидных последовательностей маркерных участков. Качество выделенной ДНК также зависит от химического состава содержимого клеток растений, для многих из которых характерно наличие большого количества вторичных метаболитов, полисахаридов и других веществ, препятствующих проведению ПЦР [6] и, следовательно, секвенированию.

В настоящее время известно значительное количество методов выделения тотальной ДНК

из клеток растений. Наиболее широко используют метод выделения с применением бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ) [7] и различные его модификации, позволяющие наиболее эффективно выделять ДНК из растительных клеток, в т.ч. с высоким содержанием фенолов или полисахаридов [8, 9]. Тем не менее в связи с вышеперечисленными трудностями, возникающими при выделении ДНК из сухих гербарных образцов, остаются актуальными работы по оптимизации и разработке новых методик, позволяющих быстро и без применения специального оборудования или расходных материалов получать ДНК нужного качества [10].

Предлагаемый в данной работе способ выделения ДНК является модификацией метода, основанного на применении ЦТАБ, и методов выделения ДНК на магнитных частицах. Разработанный метод позволяет получать качественные препараты ДНК растений, содержащих большое количество вторичных метаболитов, из гербарных образцов, собранных не позднее 60-х гг. XX века.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве образцов использовали фрагменты сухих листьев растений, относящихся к роду *Scorzonera* (Asteraceae), из гербариев МГУ им. М.В. Ломоносова (акроним – MW) и Главного ботанического сада РАН (МНА). Образцы (12 экз.) были собраны в 1920–1960 гг. (табл. 1). Для каждого образца было проведено выделение тотальной ДНК с помощью трех нижеперечисленных методов:

1) метод 1 – выделение с применением лизирующего буфера с ЦТАБ и смеси хлороформа и изоамилового спирта (по Стеуарт с соавт. [8]);

2) метод 2 – выделение ДНК по методу 1, дополненному последующей очисткой полученных препаратов с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure XP («Beckman Coulter», США), разведенных в 4 раза буфером А;

3) метод 3 – выделение ДНК с применением лизирующего буфера с ЦТАБ и очисткой препаратов с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure XP («Beckman Coulter», США), разведенных в 4 раза буфером А, без использования хлороформа и изоамилового спирта.

Состав лизирующего буфера: 2% ЦТАБ, 100 мМ Tris-HCl (рН 8,0), 20 мМ ЭДТА, 1,4 М NaCl, 1% PVP40.

Состав буфера А: 18%-ный PEG-8000 (w/v), 1 М NaCl, 10 мМ Tris-HCl (рН 8,0), 1 мМ EDTA (рН 8,0).

При помощи каждого метода выделяли тотальную ДНК из 12 образцов. Навеска для каждого выделения составляла 30 мг.

Метод 1. Необходимые реагенты:

1) лизирующий буфер;
2) смесь хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1);

3) изопропиловый спирт;

4) 80%-ный водный раствор этилового спирта;

5) деионизированная вода.

1. Навеску образца растительного материала (30 мг) вручную растереть в бумажном конверте до состояния мелкого порошка и поместить в пробирку объемом 1,5 мл.

2. Добавить к образцу 500 мкл лизирующего буфера, аккуратно перемешать.

3. Инкубировать образец в течение 1 ч при 60°, перемешивая каждые 10–15 мин.

4. К лизату добавить 500 мкл смеси хлороформа с изоамиловым спиртом, аккуратно перемешать путем переворачивания пробирки в течение 15–30 с.

5. Центрифугировать в течение 5 мин при 13 400 об/мин (12 100 g).

6. Водную фазу перенести в новую пробирку объемом 1,5 мл, повторить пп. 4–6.

7. Добавить к водной фазе равный объем изопропилового спирта, аккуратно перемешать и инкубировать при комнатной температуре 10 мин.

8. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 13 400 об/мин (12 100 g).

9. Супернатант удалить, к осадку добавить 500 мкл 80%-ного этанола, центрифугировать 2 мин, супернатант удалить. Промывку провести 2 раза.

10. Высушить осадок в течение 3–5 мин при 60°.

11. Растворить осадок в 30 мкл деионизированной воды и прогреть 5 мин при 60°.

Метод 2. Необходимые реагенты:

1) лизирующий буфер;

2) смесь хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1);

3) изопропиловый спирт;

4) 80%-ный водный раствор этилового спирта;

5) деионизированная вода;

6) магнитные частицы Agencourt AMPure XP, приготовленные для использования согласно инструкции производителя;

7) буфер А.

Выделение ДНК провести по методу 1, пп. 1–11.

12. Ресуспендировать магнитные частицы Agencourt AMPure XP до гомогенного состояния, отобрать аликвоту AMPure XP, поместить в новую пробирку. Добавить в ту же пробирку буфер А в объеме, равном 3× объему аликвоты AMPure XP. Повторно ресуспендировать.

13. К водному раствору нуклеиновых кислот добавить приготовленное разведение AMPure XP в соотношении 1 : 1 (v/v).

Таблица 1. Концентрации ДНК и соотношение значений поглощения при 260/280 и 260/230 нм при выделении суммарных нуклеиновых кислот из гербарных образцов растений рода *Scorzonera* различными методами

Но- мер об- раз- ца	Название вида	Год сбо- ра	Герба- рий	Способ выделения								
				метод 1			метод 2			метод 3		
				кон- цент- рация ДНК, нг/мкл	OD _{260/280}	OD _{260/230}	кон- цент- рация ДНК, нг/мкл	OD _{260/280}	OD _{260/230}	кон- цент- рация ДНК, нг/мкл	OD _{260/280}	OD _{260/230}
1	<i>Scorzonera latifolia</i>	1929	MW	563,1	1,78	1,55	63,9	1,91	2,17	36,8	1,89	1,72
2	<i>Scorzonera humilis</i>	1946	MW	558,5	1,77	1,62	128,8	1,91	2,24	146,6	1,93	2,21
3	<i>Scorzonera rosea</i>	1958	MW	1566,3	1,47	0,76	98,6	1,79	1,38	79,1	1,62	0,94
4	<i>Scorzonera purpurea</i>	1920	MW	176,8	1,66	0,95	9,6	2	1	14,6	1,92	1,11
5	<i>Scorzonera runcinata</i>	1962	MW	501	1	1,54	55,7	1,94	1,98	48	1,96	1,98
6	<i>Scorzonera laciniata</i>	1932	MW	363,1	4,89	-0,92	61,1	1,9	1,57	52,2	1,87	1,34
7	<i>Scorzonera austriaca</i>	1934	MW	365,5	1,93	1,76	64,1	1,96	1,87	40,8	1,99	2,17
8	<i>Scorzonera filifolia</i>	1933	MW	1434,1	1,28	0,65	102	1,34	0,69	39,9	1,43	0,71
9	<i>Scorzonera ensifolia</i>	1937	MW	575,2	1,85	1,78	120,6	1,94	2,27	120,1	1,95	2,03
10	<i>Scorzonera stricta</i>	1937	MW	278,4	1,6	0,92	133,4	1,57	0,99	38,6	1,74	1,43
11	<i>Scorzonera humilis</i>	1946	MHA	94,7	1,99	1,68	16,4	2	1,58	9,6	2,29	1,59
12	<i>Scorzonera purpurea</i>	1955	MHA	138	1,39	0,63	5,3	1,75	0,59	5,9	1,97	0,59

14. Аккуратно перемешать и инкубировать 5 мин при комнатной температуре.

Далее все процедуры проводить с использованием магнитного штатива.

15. Поместить пробирки на магнитный штатив, выдержать 2 мин и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант.

16. Добавить 200 мкл 80%-ного этилового спирта, промыть осажденные магнитные частицы, покрутив пробирку, убрать спирт. Повторить промывку 2 раза.

17. Тщательно удалить остатки этилового спирта. Высушить образец в течение 1–5 мин на столе при комнатной температуре.

18. Вынуть пробирки из штатива, добавить 30 мкл деионизированной воды, инкубировать 5 мин.

19. Поместить пробирки в магнитный штатив, выдержать 2 мин (до осаждения магнитных частиц) и, не вынимая их из магнитного штатива и не касаясь магнитных частиц, перенести супернатант в новую пробирку.

Метод 3. Необходимые реагенты:

- 1) лизирующий буфер;
- 2) изопропиловый спирт;
- 3) 80%-ный водный раствор этилового спирта;
- 4) деионизированная вода;
- 5) магнитные частицы Agencourt AMPure XP;
- 6) буфер А.

1. Навеску образца растительного материала (30 мг) вручную растереть в бумажном конверте до состояния мелкого порошка и поместить в пробирку объемом 1,5 мл.

2. Добавить 500 мкл лизирующего буфера, перемешать и инкубировать 1 ч при 60°, перемешивая образец каждые 10–15 мин.

3. Центрифугировать в течение 5 мин при 13 400 об/мин (12 100 g).

4. Перенести супернатант в новую пробирку объемом 1,5 мл и добавить равный объем изопропилового спирта.

5. Аккуратно перемешать полученную смесь и инкубировать при комнатной температуре 10 мин.

6. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 13 400 об/мин (12 100 g).

7. Супернатант удалить, к осадку добавить 500 мкл 80%-ного этанола, центрифугировать 2 мин, супернатант удалить. Промывку провести 2 раза.

8. Высушить осадок в течение 3–5 мин.

9. Растворить осадок в 30 мкл деионизированной воды и прогреть при 60° в течение 5 мин.

10. Ресуспендировать магнитные частицы Agencourt AMPure XP до гомогенного состояния, отобрать аликвоту AMPure XP, поместить в новую пробирку. Добавить в ту же пробирку буфер А в объеме, равном 3× объему аликвоты AMPure XP. Повторно ресуспендировать.

11. К растворенному осадку добавить приготовленное разведение AMPure XP в соотношении 1 : 1.

12. Аккуратно перемешать полученную смесь. Инкубировать 5 мин на столе.

Далее все процедуры проводить на магнитном штативе.

13. Поместить пробирку на магнитный штатив, выдержать 2 мин и, не вынимая пробирки из штатива, удалить супернатант.

14. Добавить 200 мкл 80%-ного этилового спирта, промыть осажденные магнитные частицы, покрутив пробирку, убрать спирт. Повторить промывку 2 раза.

15. Тщательно удалить остатки этилового спирта. Высушить в течение 1–2 мин на столе при комнатной температуре.

16. Вынуть пробирки из штатива, добавить 30 мкл деионизированной воды, инкубировать 5 мин.

17. Поместить пробирку в магнитный штатив, выдержать 2 мин (до осаждения магнитных частиц) и, не касаясь магнитных частиц, перенести супернатант в новую пробирку.

При выделении ДНК использовали следующее оборудование: твердотельный термостат СН-100 («BioSan», Латвия), миницентрифугу

MiniSpin Plus («Eppendorf», Германия), ротор F-45-12-11 («Eppendorf», Германия), магнитный штатив («ИзоГель», Россия).

Оценку концентрации суммарных нуклеиновых кислот и чистоты полученных образцов проводили при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000с («Thermo Scientific», США) и флуориметра Qubit 2.0 («Invitrogen», США). Степень фрагментированности ДНК определяли путем электрофоретического разделения в 0,8%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Оценку распределения длин фрагментов выделенной ДНК проводили с помощью Agilent Bioanalyser 2100 («Agilent Technologies», США).

Полученные препараты оценивали на пригодность использования в качестве матрицы для идентификации последовательностей ядерного и хлоропластного геномов, использующихся при проведении филогенетических исследований – фрагментов генов 5S рРНК и *rbcL*. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных при проведении ПЦР, приведены в табл. 2.

Для проведения ПЦР использовали Taq ДНК-полимеразу («New England Biolabs», США). Смесь для ПЦР готовили согласно инструкции производителя. Матрицу нормировали путем разведения до 10 нг/мкл (концентрация суммарных нуклеиновых кислот), количество матрицы в реакционной смеси – 50 нг/мкл. ПЦР с использованием праймеров 5SluA-F/5SluA-R и *rbcLa*-F/*rbcLa*-R проводили по программе: 95° – 10 мин; 30 циклов: 95° – 5 с, 57° – 30 с, 72° – 30 с; 72° – 5 мин. ПЦР с использованием праймеров *Urbcl1*/*Urbcl2* проводили по программе: 95° – 10 мин; 30 циклов: 95° – 5 с, 50° – 30 с, 72° – 35 с; 72° – 5 мин. Реакция осуществлялась в амплификаторе T-100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Препараты нуклеиновых кислот, выделенные методом 1, представляют собой смесь фрагментов ДНК размером 100–12 000 п.н. с примесью РНК. Высокая степень фрагментированности ДНК объясняется долгим сроком хранения растительного материала в условиях гербария (возраст самого молодого образца составляет >50 лет). Метод 2 отличается от метода 1 наличием стадии дополнительной очистки препарата ДНК на магнитных частицах, что приводит к удалению фрагментов ДНК размером <200 п.н. Сходные результаты получаются при использовании метода 3. Оценка качества препаратов,

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации участков генов 5S рРНК и *rbcL*

Название праймера	Последовательность праймера	Ожидаемый размер ПЦР-продукта, п.н.
5SluA-454-F* 5SluB-454-R*	5'-TTTCCCAGTCACGACGTTAGTGCTGGTATGATCGCACCC-3' 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCATGCACCGGATCCCATCAGA-3'	400–750
<i>rbcLa</i> -F** <i>rbcLa</i> -R**	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' 5'-GTAATAATCAAGTCCACCRCCG-3'	600
UrbcL1** UrbcL2**	5'-TGTCACCAAAAACAGAGACT-3' 5'-TTCCATACTTCACAAGCAGC-3'	1200

* Олигонуклеотиды 5SluA-F и 5SluA-R разработаны для высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 5S рРНК растений на платформе 454 («Roche», Швейцария) и любезно предоставлены Н.А. Мельниковой.

** Дизайн олигонуклеотидов *rbcLa*F, *rbcLa*R, UrbcL1 и UrbcL2 выполнен в соответствии с работами Кресс с соавт. [3] и Левина с соавт. [10]; синтез произведен компанией «Синтол» (Россия).

проведенная с помощью биоанализатора Agilent 2100, показала, что введение стадии очистки ДНК с помощью магнитных частиц приводит к увеличению содержания фрагментов геномной ДНК размером >300 п.н. (рис. 1), что в итоге положительно сказывается на результатах амплификации целевых последовательностей. Данный эффект особенно заметен на поврежденных образцах, изначально содержащих сильно фрагментированную геномную ДНК.

Спектрофотометрическая оценка значений концентраций препаратов нуклеиновых кислот, полученных из одного и того же гербарного образца, показала, что стандартная методика (метод 1) позволяет получить препараты с высокой (94,7–1566 нг/мкл) концентрацией ДНК. Дополнительная очистка при помощи магнитных частиц (метод 2), а также использование при выделении ДНК из гербарных образцов только магнитных частиц без применения хлороформа (метод 3) приводит к снижению показателей концентрации ДНК, соответственно, в 12–18 раз: 5,3–133,4 нг/мкл и 5,9–146,6 нг/мкл (табл. 1). Однако флуориметрическое измерение концентраций ДНК, основанное на методе применения интеркалирующего красителя (Qubit 2.0), показало существенно меньшие значения в тех же препаратах образцов, выделенных методом 1. При этом значения концентраций в образцах, выделенных всеми тремя методами, оказались сопоставимы (табл. 3). Измерение концентраций ДНК в тех же образцах, проведенное с помощью биоанализатора Agilent 2100, подтвердило показания Qubit 2.0 (данные не представлены).

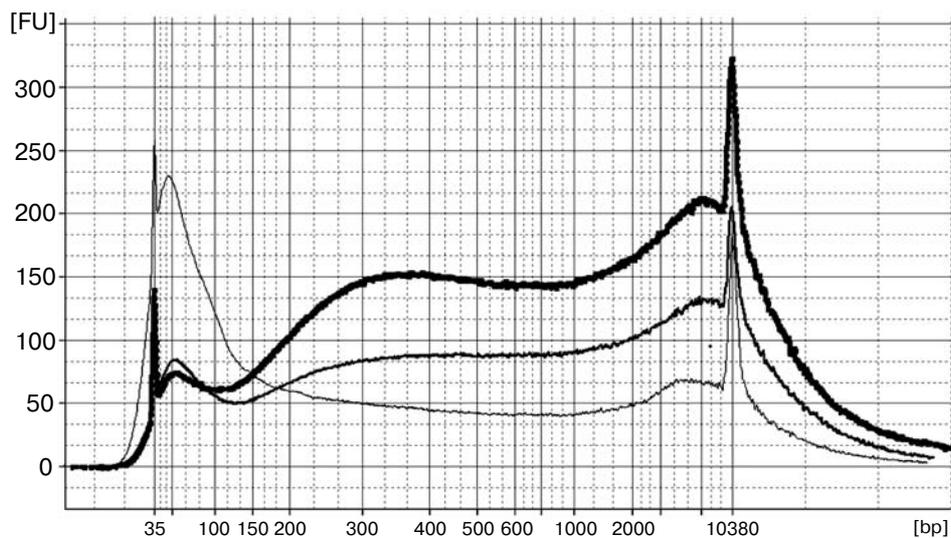
Оценка качества полученных препаратов по соотношению значений поглощения при 260/280 и 260/230 нм позволяет утверждать, что приме-

нение традиционного метода выделения ДНК (метод 1) не позволяет получить достаточно чистые препараты: $OD_{260/280}$ у большей части не попадает в диапазон 1,7–2,0, который соответствует «чистой» ДНК. Применение при выделении ДНК магнитных частиц, несмотря на снижение количества ДНК на выходе, позволяет получить более чистые препараты ($OD_{260/280}$ в диапазоне 1,7–2,0 у 10 из 12 препаратов ДНК при выделении методом 2, а также у 9 из 12 при выделении методом 3) (табл. 1).

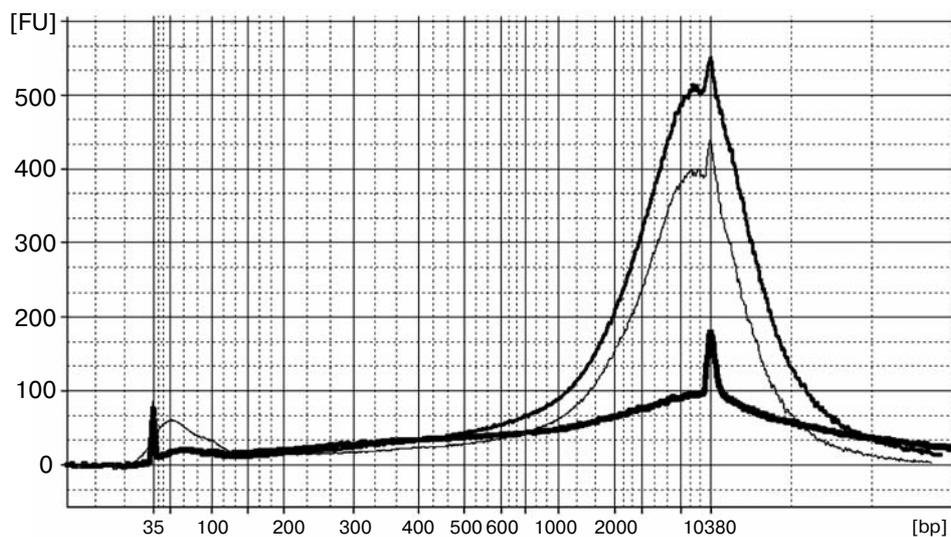
Ранее было показано, что применение расширенного метода выделения ДНК с использованием буфера с цетавлоном и очисткой хлороформом позволяет получать препараты с довольно высокой концентрацией нуклеиновых кислот. Однако при анализе препаратов ДНК методом электрофореза оказалось, что концентрация, которая определяется по абсорбции при 260 нм, не является отражением реальной концентрации нуклеиновых кислот в препарате. Скорее всего, при применении метода 1 в препаратах остаются компоненты лизирующего буфера, в частности ЦТАБ, которые могут давать погрешность при измерении концентраций с помощью спектрофотометрических методов [11].

Для оценки возможности использования ДНК, полученной с помощью предлагаемого в данной статье метода 3, для секвенирования маркерных последовательностей, используемых при проведении филогенетических исследований [12], была проведена амплификация участков ядерного и хлоропластного геномов на примере фрагментов генов 5S рРНК (400–750 п.н.) и *rbcL* (~600 п.н.). В результате проведения ПЦР с праймерами, предназначенными для амплификации фрагментов генов 5S рРНК для образ-

Образец 1
(*S. latifolia*)



Образец 2
(*S. humilis*)



Образец 3
(*S. rosea*)

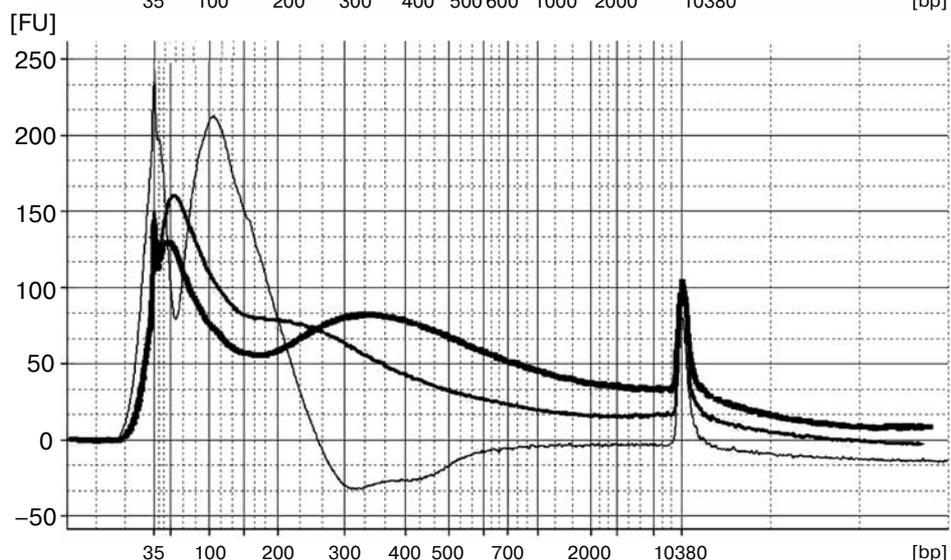


Рис. 1. Результаты капиллярного электрофореза, проведенного на приборе Agilent Bioanalyser 2100. Номера образцов соответствуют номерам гербарных образцов в табл. 1. Тонкими серыми линиями обозначены электрофореграммы образцов нуклеиновых кислот, выделенных методом 1, тонкими черными линиями – методом 2, толстыми черными линиями – методом 3. По оси Y – значение флуоресценции. По оси X – число п.н.

Таблица 3. Значения концентраций ДНК, полученные с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000c и флуориметра Qubit 2.0

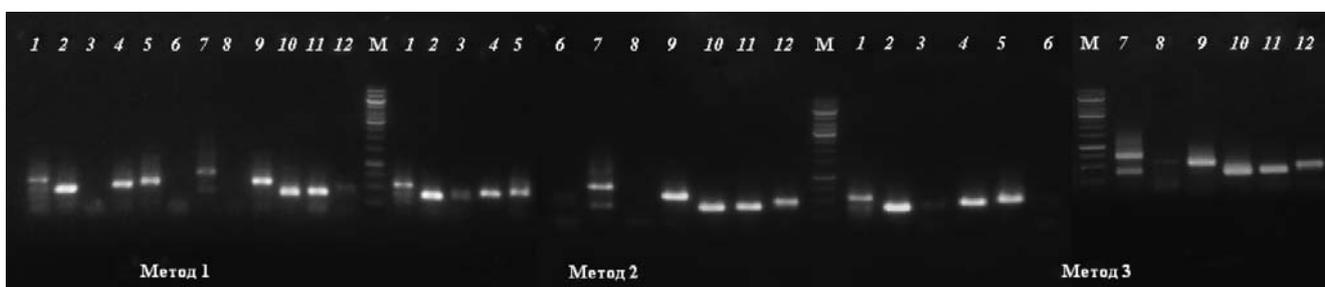
Номер образца	Вид растения	Год сбора	Гербарий	Прибор	Способ выделения		
					метод 1	метод 2	метод 3
					концентрация ДНК, нг/мкл		
1	<i>Scorzonera latifolia</i>	1929	MW	NanoDrop 2000c	563,1	63,9	36,8
				Qubit 2.0	11,9	9,2	8,3
2	<i>Scorzonera humilis</i>	1946	MW	NanoDrop 2000c	558,5	128,8	146,6
				Qubit 2.0	28,0	51,0	50,0
3	<i>Scorzonera rosea</i>	1958	MW	NanoDrop 2000c	1566,3	98,6	79,1
				Qubit 2.0	9,1	9,2	3,3

цов 3, 6 и 8, выделенных методом 1, продуктов амплификации получено не было. Выделение ДНК с дополнительной очисткой при помощи магнитных частиц (метод 2) позволило получить целевой продукт при амплификации образцов 3 и 6. Достигнуть положительного результата при проведении ПЦР с теми же условиями для образца 8 удалось только при применении третьего метода выделения ДНК. Для остальных образцов продукты амплификации длиной 400–750 п.н. при проведении ПЦР с праймерами 5SluA-F/5SluA-R были получены при использовании любого из описанных методов (рис. 2).

При амплификации последовательностей, кодирующих фрагмент гена *rbcL*, целевой продукт был получен для восьми образцов, выделенных методом 1, и для 11 образцов, выделенных методами 2 и 3, что также свидетельствует в пользу необходимости введения стадии очистки геномной ДНК с помощью магнитных частиц.

Растениям рода *Scorzonera* свойственно наличие большого количества различных вторичных метаболитов [13]. Улучшение результатов ПЦР, проведенной в присутствии в качестве матрицы препаратов ДНК, полученных с использованием методов, включающих очистку на магнитных частицах, может быть связано с более эффективной очисткой от различных веществ, которые ингибируют работу ферментов [14]. Аналогичный эффект может оказывать увеличение средней длины фрагментов выделенной тотальной геномной ДНК, что, как было показано в настоящей работе, достигается применением магнитных частиц для очистки препаратов ДНК от примесей.

Амплификация участков хлоропластного генома, кодирующих полные последовательности большой субъединицы гена *rbcL* размером ~1200 п.н., в образцах, ДНК которых была выделена с помощью метода 1, привела к образованию ожидаемого продукта только в одном случае (образец 7). Использование методов 2 и 3

**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов гена 5S рРНК. Номера дорожек 1–12 соответствуют номерам гербарных образцов в табл. 1. М – ДНК-маркер GeneRuler, 1000 п.н. («Thermo Scientific», США)

позволило получить продукт амплификации для двух образцов (4 и 7). Тот факт, что продукты амплификации гена *rbcL* не удалось получить для большинства полученных препаратов ДНК, скорее всего, связан с тем, что ДНК часто сильно деградирует при хранении гербарных образцов. При этом степень фрагментации ДНК не зависит от возраста гербарного образца. В частности, фрагменты хлоропластного генома, кодирующие полные последовательности гена *rbcL*, удалось получить с применением в качестве матрицы ДНК, выделенной из сборов 1920 и 1934 гг., но не удалось — для образцов, заложенных на хранение на четверть века позже. Аналогично к выводам об отсутствии прямой зависимости деградации ДНК от сроков хранения пришли ранее исследователи, также работавшие с гербарными образцами представителей других систематических групп растений [6, 15].

Применение метода выделения ДНК с помощью магнитных частиц без очистки хлоро-

формом позволяет получать препараты ДНК с качеством, достаточным для дальнейшего их использования в качестве матрицы при ПЦР. Полученные препараты ДНК могут быть использованы для успешной амплификации маркерных последовательностей ядерного и хлоропластного геномов в диапазоне 400–750 п.н. и, с меньшей вероятностью, для проведения амплификации фрагментов генома размером >1000 п.н. Поскольку предложенный способ выделения ДНК занимает сравнительно мало времени и не включает реактивов, требующих специальных условий хранения или использования, его можно применять в большинстве лабораторий для одновременного выделения ДНК из значительного количества образцов, в т.ч. с целью проведения паспортизации видов растений, хранящихся в гербарных фондах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sukhorukov, A.P., Mavrodiyev, E.V., Struwig, M., Nilova, M.V., Dzhililova, Kh.Kh., Balandin, S.A., Erst, A., and Krinitsyna, A.A. (2015) One-seeded fruits in the core Caryophyllales: their origin and structural diversity, *PLoS One*, **10**, 1–38.
2. Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., and Hickey, D.A. (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics, *Trends Genet.*, **23**, 167–172.
3. Kress, W.J., and Erickson, D.L. (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region, *PLoS One*, **2**, e508.
4. Kress, W.J., Erickson, D.L., Jones, F.A., Swenson, N.G., Perez, R., Sanjurjo, O., and Bermingham, E. (2009) Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama, *PNAS*, **106**, 18621–18626.
5. Srinivansan, M., Sedmak, D., and Jewell, S. (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids, *Am J. Pathol.*, **161**, 1961–1971.
6. Doyle, J.J., and Dickson, E.E. (1987) Preservation of plant species for DNA restriction endonuclease analysis, *Taxon*, **36**, 715–722.
7. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phyt. Bull.*, **19**, 11–15.
8. Stewart, Jr., C.N., and Via, L.E. (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications, *BioTechniques*, **14**, 748–749.
9. Porebski, S., Bailey L.G., and Baum, B.R. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **15**, 8–15.
10. Sarkinen, T., Staats, M., Richardson, J.E., Cowan, R.S., and Bakker, F.T. (2012) How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens, *PLoS One*, **7**, e43808.
11. Drabkova, L., Kirschner, J., and Vlcek, C. (2002) Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **20**, 161–175.
12. Levin, R.A., Wagner, W.L., Hoch, P.C., Nepokroeff, M., Piers, J.C., Zimmer, E.A., and Sytsma, K.J. (2003) Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data, *Am. J. Bot.*, **90**, 107–115.
13. Sar, A., Zidorn, C., Ellmerer, Ernst P., Ozgokce, F., Ongania, K.-H., and Stuppner, H. (2007) Phenolic compounds from *Scorzonera tomentosa* L., *HCA*, **90**, 311–317.
14. Sharma, A.D., Gill, P.K., and Singh, P. (2002) DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **20**, 415a–415f.
15. Erkens, R.H.J., Cross, H., Maas, J.W., Hoenselaar, K., and Chatrou, L.W. (2008) Assessment of age and greenness of herbarium specimens as predictors for successful extraction and amplification of DNA, *BLUMEA*, **53**, 407–428.

A SIMPLE AND RAPID METHOD FOR DNA EXTRACTION FROM OLD HERBARIUM SPECIMENS

A. A. Krinitsina^{1*}, T. V. Sizova², M. A. Zaika¹,
A. S. Speranskaya^{1,3}, A. P. Sukhorukov¹

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-4309,
E-mail: info@mail.bio.msu.ru*

² *N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy
of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow 119333, Russia;
fax: +7(499)132-8962, E-mail: iogen@vigg.ru*

³ *Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service
on Customers Rights Protection and Human Well-being Surveillance,
ul. Novogireevskaja 3a, Moscow 111123, Russia;
fax: +7(495)304-2209*

Received July 6, 2015

Revision received July 24, 2015

In this work, we report a rapid and cost-effective method for the extraction of total DNA from herbarium specimens up to 50–90 years old. This method, based on the use of AMPure XP magnetic beads diluted by PEG-8000 containing buffer, takes about 2 hours, does not require volatile components like chloroform, phenol and liquid nitrogen, and yields up to 4000 ng of total DNA with high purity from about 30 mg of dry material. The quality of the extracted DNA was tested by PCR amplification of 5S rRNA and *rbcL* genes (nuclear and chloroplast DNA markers) and compared with traditional chloroform:isoamyl alcohol method. Our results demonstrate that use of magnetic beads for DNA extraction from herbarium specimens is crucial for successful PCR amplification, since it decreases concentration of inhibitors, reduces concentration of short DNA fragments and increases median DNA fragment length.

Key words: DNA extraction, herbarium, PCR, 5S rRNA, *rbcL*, genomic markers, sequence