

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ЕЕ ЦЕЛОСТНОСТИ

Одним из современных методов оценки генотоксического действия неблагоприятных факторов среды на организм является оценка уровня кластерных повреждений ДНК (Georgakilas A. G., 2014). Метод обладая чувствительностью сопоставимой с анализом уровня фосфорилированных гистонов γ H2AX позволяет кроме уровня разрывов, оценивать также характер повреждений. Для корректного применения данного метода важным является качество образцов ДНК – в первую очередь низкий уровень фрагментации и отсутствие окислительных модификаций, возникающих *de novo* в процессе выделения. Целью настоящего исследования является сравнение качества образцов ДНК, полученных различными методами в контексте оценки её сохранности.

Выделение ДНК образцов миокарда крысы осуществляли с помощью фенол-хлороформной экстракции (ФХЭ), безфенольным методом с цетримониумом бромидом (СТАВ), при помощи коммерческих наборов Нуклеосорб (Праймтех), ДНК-Экстран-2 (Синтол), High Pure Purification Kit (Thermo Scientific) как описано ранее (Долматович С.С., 2014), а также по методу High Pure Purification Kit (Roche) с добавлением антиоксиданта TEMPOL. Для электрофоретического разделения (75 V, 70 mA, 60 мин) в лунки 1% агарозного геля вносили стандарты и образцы ДНК массой 41 нг.

По данным спектрофотометрических исследований (см. таблицу) все образцы нуклеиновых кислот были высокой степени чистоты. Наименьший выход наблюдали в наборе 1, остальные методы давали сопоставимые результаты.

№	Метод/Набор	260 нм	280 нм	320 нм	260/280	Концентрация ДНК, нг/мкл
1	«Нуклеосорб»	0,051	0,015	0,022	2,199	3,30
2	«ДНК-Экстран-2»	0,426	0,224	0,014	2,002	19,80
3	ФХЭ	0,335	0,152	0,058	2,204	17,70
4	СТАВ	0,498	0,230	0,069	2,098	25,50
5	High Pure Purification Kit	0,220	0,115	-0,027	1,907	11,097

Результаты электрофоретического анализа показали, для образцов 1, 2 и 4 характерна высокая степень фрагментации ДНК. Образцы 2, 3 и 4 характеризуются присутствием низкомолекулярных продуктов в области 50–500 п.о. Образец ДНК (№ 5), выделенный по предлагаемой методике с антиоксидантом отличается малой степенью фрагментации. Средний размер фрагментов >10 000 п.о., фрагменты размером менее 4000 п.о. практически не выявляются.

Т.о. по формальным признакам образцы ДНК, полученные методом с антиоксидантом на силика-колонках пригодны для последующего анализа кластерных повреждений.

Shafarost A. S., Dolmatovich S. S., Petrenyov D. R.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DNA ISOLATION METHODS TO DETERMINE THE DEGREE OF ITS INTEGRITY

Authors compared some common methods of DNA isolation. The method of DNA isolation on the silica column with TEMPOL allows obtaining DNA samples with low level of fragmentation what fulfills requirements to samples of DNA for cluster damage analysis.