

Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет

СБОР И ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Методические указания по выполнению практических работ
для обучающихся всех форм обучения направления подготовки
35.04.07 «Водные биоресурсы и аквакультура»

Владивосток
2020

УДК 574.55 + 574.52(075.8)

Автор – С.В. Туранов, К.б.н., доцент кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура» ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз», старший научный сотрудник ННЦМБ ДВО РАН.

Рецензент – Жадько Е.А., К.б.н., доцент кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура» ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз»

Печатается в авторской редакции

Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет, 2020 г.

Методические указания составлены¹ согласно учебному плану для студентов всех форм обучения направления подготовки «Водные биоресурсы и аквакультура» в рамках дисциплины (модуля) «Методы молекулярной генетики в аквакультуре, при исследовании биоразнообразия и филогении».

Умение специалиста-биолога правильно собрать и зафиксировать ДНК из водной среды с наименьшими рисками для её деградации и перекрёстной контаминации образцов является обязательным навыком, определяющим возможность адекватного применения неинвазивных методов в аквакультуре и смежных направлениях, связанных с оценкой различных характеристик биологического разнообразия водных организмов, а также мероприятий по сохранению генетической стабильности природных и искусственно поддерживаемых популяций.

Настоящие методические указания помогут студентам-биологам, а также специалистам рыбного хозяйства освоить базовые навыки сбора и фиксации ДНК из водной среды, а также её выделения для последующего проведения молекулярно-генетического анализа.

¹ При частичной финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (грант МК-305.2019.4)

Содержание

Лабораторная работа №1	5
Задача: провести сбор, фильтрацию воды и фиксацию ДНК из водной среды на шприцевых фильтрах.	5
Лабораторная работа №2.....	8
Задача: провести выделение ДНК из префиксированных шприцевых фильтров.	8
Список литературы	13

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

Сбор и фиксация ДНК из водной среды

ДНК из окружающей среды, или средовая ДНК, или экоДНК [1] или ДНКос [2] (англ. eDNA, environmental DNA) - как правило, внеклеточная ДНК, которая может быть собрана из воды, почвы, снега, пыли и многих других источников [3-5]. В отличие от ДНК отдельного организма (индивидуальный образец ДНК) средовая ДНК в настоящее время чаще всего применяется в качестве инструмента для мета-анализа таксономического и генетического разнообразия природных сообществ [4, 6]. Кроме того, с помощью соответствующих методов, она может использоваться для идентификации конкретных видовых таксонов с целью подтверждения их нахождения в определённом месте [3, 7].

На этапе сбора ДНК из водной среды перед исследователем встаёт вопрос о выборе метода для фильтрации и фиксирования ДНК из окружающей среды в целях обеспечения возможности наиболее длительного хранения без существенной деградации нуклеиновых кислот, в т.ч. без заморозки (до 2 недель). Кроме того, метод должен гарантировать простоту сбора материала в полевых условиях с минимальным риском перекрёстной контаминации. Дополнительным условием должна быть мобильность и простота сбора и фиксации для того, чтобы «набор» можно было отправить коллегам в любую точку страны или мира для осуществления сбора образца воды и пересылки зафиксированного фильтра обратно. Для российской части актуален вопрос использования неспиртовых фиксирующих растворов. Известны замечательные разработки зарубежных коллег из Smith-Root [8], а также готовые наборы от NatureMetrics [9], однако при их использовании стоимость стандартного исследования на местах становится на порядок выше в сравнении с тем, что можно предложить в настоящих методических рекомендациях.

ЗАДАЧА: провести сбор, фильтрацию воды и фиксацию ДНК из водной среды на шприцевых фильтрах.

Цель работы: получить навыки сбора и фиксации ДНК из водной среды.

Оборудование и материалы:

1. Вода (доставляется из точки взятия проб в стерильной таре либо набирается шприцем непосредственно на точке взятия).
2. Шприц Жане объемом 150 мл трехдетальный однократного применения с наконечником «Луер-Лок».
3. Шприц одноразовый объёмом от 1 мл.
4. Фильтрующая насадка диаметром 25 мм с размером пор - 0,45 мкм. Стерильная. Материал изготовления - PES.
5. Пробирка объемом 2 мл с буфером для фиксации фильтров (здесь - буфер Лонгмайера).
6. Комби-стоппер заглушки с винтовым соединением Луер-Лок с наружной и внутренней резьбой.
7. Перчатки смотровые.
8. Бумажная этикетка.
9. Простой карандаш.
10. Zip-пакеты 10×15 см.

Ход работы:

1. Надевают перчатки.
2. Достают и распаковывают шприц Жане.
3. Набирают в шприц Жане воду до отметки 150 мл.
4. Достают фильтрующую насадку и присоединяют её к выводу концу шприца через соединение луер-лок.
5. Продавливают воду из шприца через фильтрующую насадку.
6. Снимают фильтрующую насадку перед следующим забором воды.
7. Повторяют процедуры забора и продавливания воды через фильтрующую насадку в зависимости от требуемого для анализа объёма воды. Рекомендуется пропустить через фильтр не менее 450 мл.
8. Пропускают с помощью шприца через фильтрующую насадку воздух для удаления остатков воды.
9. Снимают фильтрующую насадку со шприца Жане.
9. Достают пробирку с буфером Лонгмайера и шприц малого объёма.
10. Набирают содержимое пробирки в шприц малого объёма.

11. Надевают фильтрующую насадку **входным** концом на шприц и пропускают содержимое шприца через фильтрующую насадку. Шприц не снимают.

12. Устанавливают заглушку комби-стоппер **тонким** концом на **выходной** конец фильтрующей насадки. Шприц не снимают.

13. Снимают шприц с **входного** конца фильтрующей насадки и надевают на него комби-стоппер концом **луер-лок**.

14. Подписывают простым карандашом этикетку с указанием даты и места сбора воды, а также объёма воды, пропущенной через шприцевую насадку. Помещают этикетку в zip-пакет вместе с фильтрующей насадкой. Хранят при необходимости до 2 недель при температуре окружающей среды. Рекомендуемый режим хранения: -20 °C.

Контрольные вопросы к лабораторной работе:

1. Для чего необходимо освоение методов сбора и фиксации ДНК из водной среды?

2. Каким образом обеспечить защиту от перекрёстной контаминации ДНК и её контроль при заборе и фиксации проб воды и для чего она необходима?

3. Какую функцию выполняет буфер Лонгмайера, которым заполняют шприцевую насадку по завершению фильтрации воды?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

Выделение ДНК из фильтров шприцевых насадок

При выделении средовой ДНК из шприцевых фильтров возникают дополнительные трудности, которые не встречаются при обработке индивидуальных фильтров после вакуумной фильтрации воды, а также при обычных способах выделения организменной ДНК из тканей гидробионтов [10]. Так, необходимо каким-либо способом извлечь максимальное количество осевшей на фильтре нуклеиновой кислоты, не прибегая при этом к уничтожению или вскрытию самой фильтрующей насадки. Весьма успешный опыт выделения нуклеиновых кислот из фильтрующих шприцевых насадок известен благодаря соответствующему опыту микробиологов [11, 12]. В данных методических рекомендациях приводится модифицированный протокол выделения, без применения предварительной обработки фильтров ультразвуком [12, 13]. Используется коммерческий набор "М-Сорб-ООМ" от компании Синтол, который идеально подходит для выделения ДНК из образцов окружающей среды.

ЗАДАЧА: провести выделение ДНК из префиксированных шприцевых фильтров.

Цель работы: освоить навыки выделения средовой ДНК из шприцевых фильтров.

Оборудование и материалы:

1. Коммерческий набор "М-Сорб-ООМ" от компании Синтол (г. Москва).
2. Перчатки смотровые.
3. Наконечники с фильтром объёмом до 1000, 200 и 10 мкл.
4. Распылитель с 10% раствором отбеливателя (Chlorox, белизна и т.п.).
5. Микроцентрифужные пробирки типа Eppendorf объёмом 1.5-2 мл.
6. Шприцы одноразовые объёмом от 1 до 5 мл.
7. Адаптер диффузионный female/female.

8. Вортекс.
9. Центрифуга с ротором для пробирок объёмом 1.5-2 мл.
10. Дозаторы переменного объёма.
11. Штативы для хранения пробирок на 1.5-2 мл (RP-100 или RP-80).
12. Штативы для пробирок на 1.5-2 мл «рабочее место».
13. Магнитный штатив для пробирок объёмом 1.5-2 мл.

Ход работы:

1. С вечера оставляют реактивы (набор М-Сорб-ООМ) и образцы (фиксированные фильтровальные насадки) при комнатной температуре.

2. Во избежание контаминации в рабочей комнате избавляются от чужеродной ДНК, т.е. обрабатывают рабочую поверхность столов и бокса, штативы, дозаторы, центрифугу (и ротор) 10% раствором отбеливателя. Бокс, в котором будет проводиться выделение, необходимо предварительно простерилизовать УФ-облучением.

3. В соответствии с количеством проб, из которых будет выделена ДНК, разносят лизирующий раствор объёмом по 600 мкл в индивидуальные пробирки, прогревают пробирки с лизирующим раствором до температуры 65°C непосредственно перед началом выделения. Все реактивы из набора перед началом выделения перемешивают плавным переворачиванием.

4. Подготавливают и маркируют 2 набора пробирок объёмом 1.5-2 мл для смыва содержимого шприцевого фильтра в соответствии с количеством проб, которое необходимо обработать. Одна из пробирок должна быть обозначена как «контроль».

5. Надев новую пару перчаток, берут новый шприц и с помощью иглы набирают из пробирки в шприц разогретый лизирующий раствор.

6. Достают из индивидуальной упаковки и присоединяют к **выходному** отверстию шприца новый диффузионный адаптер.

7. Берут префиксированный шприцевой фильтр, избавляются от заглушки на **выходном** конце фильтра.

8. Соединяют свободный конец диффузионного адаптера с **выходным** отверстием фильтра.

9. Избавляются от заглушки на **входном** конце фильтра.

10. Подносят всю конструкцию (шприц-диффузионный адаптер-фильтрующая насадка) **входным** отверстием фильтра к подго-

товленной пробирке и пропускают через эту конструкцию в пробирку лизирующий раствор из шприца.

11. Снимают с конструкции шприц, набирают воздух (до 3 кубических см) и пропускают воздух через фильтр для сливания в пробирку остатков лизирующего раствора.

12. Вносят в каждую пробирку 10 мкл **Лизирующего компонента**.

13. Вносят 100 мкл **ОКО** в качестве отрицательного образца в пробирку, обозначенную как «контроль».

14. Пробирки закрывают и их содержимое перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе.

15. Инкубируют пробирки 15 минут при температуре 65 °С.

16. Помещают пробирки в штатив, охлаждают и перемешивают.

17. Центрифугируют пробирки в течение 30 секунд при максимальных оборотах на микроцентрифуге для осаждения капель с крышек пробирок.

18. Вносят в пробирки по 10 мкл **ВПК-В-РНК**, перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и осаждают капли с крышек пробирок.

19. Пробирку с **Сорбирующим раствором** перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе.

20. Вносят в пробирки с исследуемым материалом по 60 мкл **Сорбирующего раствора** и 400 мкл **Осаждающего раствора**, закрывают крышки.

21. Перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента и инкубируют в течение 5 минут при комнатной температуре.

22. Центрифугируют пробирки в течение 3 минут на микроцентрифуге-встряхивателе на максимальных оборотах, либо на высокоскоростной центрифуге для микропробирок при 10 тыс. об/мин в течение 15 секунд и устанавливают в магнитный штатив на минуту.

23. Открывают крышки пробирок, удаляют надосадочную жидкость.

24. Вносят в пробирки 500 мкл **Промывочного раствора А**, закрывают крышки и перемешивают содержимое пробирок на мик-

роцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.

25. Центрифугируют пробирки в течение 30 секунд на микроцентрифуге-встряхивателе и устанавливают в магнитный штатив на 1 минуту.

26. Открывают крышки пробирок, удаляют надосадочную жидкость.

27. Вносят в пробирки 500 мкл **Промывочного раствора В**, закрывают крышки и перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.

28. Центрифугируют пробирки в течение 30 секунд на микроцентрифуге-встряхивателе и устанавливают в магнитный штатив на 1 минуту.

29. Открывают крышки пробирок, удаляют надосадочную жидкость.

30. Вносят в пробирки 500 мкл **Промывочного раствора С**, закрывают крышки и перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.

31. Центрифугируют пробирки в течение 30 секунд на микроцентрифуге-встряхивателе и устанавливают в магнитный штатив на 1 минуту.

32. Открывают крышки пробирок, удаляют надосадочную жидкость.

33. Инкубируют пробирки с открытыми крышками в течение 5 минут при температуре 65 °С для удаления остатков промывочного раствора С.

34. Добавляют в пробирки по 100 мкл **Элюирующего раствора**, закрывают крышки и перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.

35. Термостатируют пробирки в течение 10 минут при температуре 65 °С.

36. Центрифугируют пробирки в течение 30 секунд на микроцентрифуге-встряхивателе и устанавливают в магнитный штатив на 1 минуту.

37. Переносят из пробирок водную фазу, содержащую ДНК, в предварительно промаркированные 1,5 мл пробирки. Раствор НК

до проведения анализа рекомендуется хранить при температуре минус 20 °С.

Контрольные вопросы к лабораторной работе:

1. Каким образом и для каких целей перед выделением средовой ДНК осуществляется обработка рабочих поверхностей хлорсодержащим агентом?

2. Для чего при выделении средовой ДНК необходим отрицательный контроль?

3. В чём состоит особенность методов выделения ДНК на магнитных частицах?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Электронный ресурс «Сахалинский Таймень в XXI веке». – Режим доступа: <http://sakhtaimen.ru/ru/news/51/>.
2. Кирильчик, С.В. Апробация метода количественного анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля / С.В. Кирильчик, М.М. Макаров, П.Н. Аношко, М.С. Астахова, И.Н. Смолин, Е.В. Дзюба // Международный Журнал Прикладных и Фундаментальных Исследований. – 2018. – № 6. – С. 98-102.
3. Ficetola, G.F. Species detection using environmental DNA from water samples / G.F. Ficetola, C. Miaud, F. Pompanon, P. Taberlet // Biology Letters. – 2008. – Vol. 4. – №. 4. – P. 423-425.
4. Bohmann, K. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring / K. Bohmann, A. Evans, M. Thomas, P. Gilbert, G.R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D.W. Yu, M. deBruyn // Trends in Ecology & Evolution. – 2014. – Vol. 29. – №. 6. – P. 358-367.
5. Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring / P. Taberlet [et al.]; - Oxford. - Oxford University Press., 2018. – 247 pp.
6. Beng, K.C. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects / K.C. Beng, R.T. Corlett // Biodiversity and Conservation. – 2020. – P. 1-33.
7. Levi, T. Environmental DNA for the enumeration and management of Pacific salmon / T. Levi, J.M. Allen, D. Bell, J. Joyce, J.R. Russell, D.A. Tallmon, S.C. Vulstek, C. Yang, D. W. Yu // Molecular Ecology Resources. – 2019. – Vol. 19. – №. 3. – P. 597-608.
8. Thomas, A.C. ANDe™: A fully integrated environmental DNA sampling system / A.C. Thomas, J. Howard, P.L. Nguyen, T.A. Seimon, C.S. Goldberg // Methods in Ecology and Evolution. – 2018. – Vol. 9. – №. 6. – P. 1379-1385.
9. Электронный ресурс «NatureMetrics DNA-Based Monitoring». – Режим доступа: <https://edna-discovery.life/>.
10. Туранов, С.В. Методы фиксации образцов и выделения genomic ДНК из тканей гидробионтов [Текст]: Методиче-

- ские указания / С.В. Туранов. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2017. – 20 с.
11. Somerville, C.C. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments / C.C. Somerville, I.T. Knight, W.L. Straube, R.R. Colwell // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1989. – Vol. 55. – №. 3. – P. 548-554.
 12. Kesberg, A.I. Improved protocol for recovery of bacterial DNA from water filters: Sonication and backflushing of commercial syringe filters / A.I. Kesberg, D. Schleheck // *Journal of Microbiological Methods*. – 2013. – Vol. 93. – №. 1. – P. 55-57.
 13. Dzhenloda, R.K. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection / R.K. Dzhenloda, D.G. Petrov, V.M. Shkinev, B.Y. Spivakov // *Mendelev Communications*. – 2017. – Vol. 27. – №. 3. – P. 302-303.