



Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования

**«Крымский федеральный университет  
имени В.И. Вернадского»**

295007 Республика Крым, г. Симферополь,  
проспект Академика Вернадского, 4

**Отдел интеллектуальной собственности**

Начальник отдела:  
Бондаренко Даниил Владимирович  
Тел. раб. +7(3652)51 08 69  
Тел. моб. +7(978) 618 63 17  
[E-mail:work.daniil@mail.ru](mailto:work.daniil@mail.ru)

г. Симферополь, ул. Ялтинская, 20, каб. 308

**КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ В.И. ВЕРНАДСКОГО**



*Отдел интеллектуальной  
собственности*

**БИОТЕХНОЛОГИЯ  
№3**

2026 г.

## **Патент на изобретение № 2869116**

### **Авторы:**

**Билык Анастасия Ивановна,**

**Гафуров Айрат Рафисович,**

**Сидякин Андрей Иванович**

### **Экстракционный буфер для выделения геномной ДНК из растительного материала винограда (*Vitis sp.*) и способ его получения**

Изобретение относится к молекулярной генетике и биотехнологии, а именно к способам получения препаратов геномной ДНК высокой концентрации и степени чистоты из растительного материала винограда. Задачей изобретения является разработка состава экстракционного буфера, который обеспечивает получение препаратов нативной ДНК высокой концентрации оцениваемой методом флюориметрии (не ниже 200 нг/мкл) и степени чистоты оцениваемой методом спектрофотометрии (выражаемой в отношении поглощения элюата на длинах волн 260 и 280 нм (OD260/OD280) 1,8-2,0) при использовании максимально доступных реактивов и оборудования.

Техническим результатом при осуществлении заявленного изобретения является получение экстракционного буфера пригодного для выделения тотальной неповрежденной ДНК из растительного материала винограда, отличающейся высокой концентрацией и степенью чистоты. Способ осуществления изобретения

Способ получения экстракционного буфера. Готовят раствор экстракционного буфера (100 мл) в следующем порядке: точную навеску 0,336 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и 1,576 г трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорида и растворяют в 60 мл свободной от ДНКаз воды и доводят pH до значения 8,0 1 М гидроксидом натрия. В отдельный ёмкости (без ДНКаз и РНКаз) отвешивают 3,000 г цетилтриметиламмония бромид, 15,194 г хлорида натрия. Навески растворяют в приготовленном изначально растворе динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорида, добавляют 5,000 мл 2-сульфанилэтан-1-ола и доводят

объем до 100 мл свободной от ДНКаз водой. Готовый буферный раствор, для экстракции тотальной ДНК из растительного материала винограда в итоге содержит: 100,0 мМ трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорида, 10,00 мМ динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, 2,600 М хлорида натрия, 3% цетилтриметиламмония бромид, 5% 2-сульфанилэтан-1-ола. Полученную смесь делят на аликвоты по пробиркам и нагревают до температуры 65 С для дальнейшего использования как описано ниже.

Экстракция ДНК из растительного материала винограда с использованием описанного буфера осуществляется следующим образом. Навеска листовой ткани винограда массой 100 мг гомогенизируется в 1000 мкл нагретого до 65 С экстракционного буфера, гомогенат переносится в 2 мл пробирку типа эппендорф и инкубируется в течение 60 минут при 65 С. Далее к гомогенату прибавляют равный объем смеси трихлорметан:изоамиловый спирт (при объемном соотношении смеси равной 24:1) и интенсивным встряхиванием-переворачиванием в течение 3 минут гомогената с трихлорметаном и изоамиловым спиртом получают эмульсию. Полученную эмульсию центрифугируют 10 минут при 13400 g и температуре 4 С для разделения фаз. Аликвота водной (верхней) фазы объемом 700 мкл переносится в 1,5 мл пробирку типа эппендорф, свободную от ДНКаз, и к ней (водной фазе) повторно добавляется равный объем смеси трихлорметан:изоамиловый спирт, интенсивным встряхиванием-переворачиванием в течение 3 минут достигают получение эмульсии. Полученную эмульсию центрифугируют 10 минут при 13400 g и температуре 4 С для разделения фаз. Часть водной фазы объемом 400 мкл, содержащая тотальную ДНК переносится в новую 1,5 мл пробирку типа эппендорф, свободную от ДНКаз, и к ней для осаждения препарата тотальной ДНК добавляется половина объема (от объема полученной водной фазы) 5 М раствора хлорида натрия и два объема (от объема полученной водной фазы) 95% этилового спирта. Смесь, содержащую тотальную ДНК, хлорид натрия и этанол инкубируют в течение 20 минут при температуре 4°С для осаждения ДНК. Сформировавшийся осадок ДНК после инкубации в этанол-хлоридной смеси выделяют в виде осадка центрифугированием при 13400 g и 4°С в течение 10

минут. Супернатант удаляется и к осадку ДНК аккуратно приливают 1000 мкл 70% этанола для отмывки остатков хлорида натрия лёгким встряхиванием пробирок (не используя вортекс). Для удаления отмывочной смеси от осадка ДНК проводится центрифугирование при 13400 g при 4°С в течение 10 минут. Надосадочная жидкость удаляется и к осадку тотальной ДНК для более тщательной очистки ДНК от следов хлорида натрия повторно аккуратно добавляется 800 мкл 95% этанола. Суспензия ДНК центрифугируется при 13400 g и 4°С в течение 10 минут. Супернатант удаляется, осадок высушивается при 65°С до полного исчезновения запаха этанола и ресуспендируется в 100 мкл свободной от ДНКаз воды или ТЕ-буфера.

### **Формула изобретения**

1. Экстракционный буфер для выделения геномной ДНК из растительного материала винограда (*Vitis sp.*), включающий 100 мМ трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорида pH 8,0, цетилтриметиламмония бромид, 2-сульфанилэтан-1-ол, динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0, хлорида натрия, отличающийся тем, что концентрация цетилтриметиламмония бромид 3%, 2-сульфанилэтан-1-ола 5%, динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0 10 мМ, хлорида натрия 2,6 М, без поливинилпирролидона.

2. Способ получения экстракционного буфера по п.1, включающий растворение 0,336 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и 1,576 г трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорида в 60 мл свободной от ДНКаз воды и доведение pH до значения 8,0 1 М гидроксидом натрия, добавление 3 г цетилтриметиламмония бромид, 15,194 г хлорида натрия, 5 мл 2-сульфанилэтан-1-ола и доведение объема готового раствора до 100 мл свободной от ДНКаз водой.