



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
№4**

2026 г.

Патент на изобретение № 2869118

Авторы:

**Гафуров Айрат Рафисович,
Билык Анастасия Ивановна,
Сидякин Андрей Иванович**

Экстракционный буфер для выделения геномной ДНК из растительного материала сорго (*Sorghum* 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 сорго. Задачей изобретения является разработка состава экстракционного буфера, который обеспечивает получение препаратов нативной ДНК высокой концентрации (не ниже 150 нг/мкл) и степени чистоты (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 сорго, отличающейся высокой концентрацией и степенью чистоты. Способ осуществления изобретения.

Способ получения экстракционного буфера. Готовят раствор экстракционного буфера (100 мл) в следующем порядке: взвешивают навеску 0,168 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 отдельной ёмкости (без ДНКаз и РНКаз) отвешивают 4,000 г цетилтриметиламмония бромида, 12,857 г хлорида натрия и, если буфер планируется использовать сразу, 1,000 г поливинилпирролидона с молекулярной массой 40 кДа. 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 конечного объема 100 мл свободной от ДНКаз водой. Готовый буферный раствор, для экстракции тотальной ДНК из растительного материала сорго в итоге содержит: 100,0 мМ трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорида, 5,00 мМ динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, 2,200 М хлорида натрия, 4 % цетилтриметиламмония бромида, 5 %

2-сульфанилэтан-1-ола и 1 % поливинилпирролидона с молекулярной массой 40 кДа. Полученную смесь делят на аликвоты по пробиркам и нагревают до температуры 65 °С для дальнейшего использования в качестве экстракционного буфера для выделения тотальной ДНК из растительного материала сорго как описано ниже.

Экстракция ДНК из растительного материала сорго с использованием описанного буфера осуществляется следующим образом. Навеска листовой ткани сорго 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 75 минут. Далее к нему добавляется равный объем смеси трихлорметан:изоамиловый спирт (24:1) и интенсивным встряхиванием-переворачиванием в течение 3 минут достигается получение эмульсии. Полученную эмульсию центрифугируют 10 минут при 13000 g и температуре 4 °С для разделения фаз. Водная (верхняя) фаза переносится в 1,5 мл пробирку типа эппендорф свободную от ДНКаз и к ней (водной фазе) повторно добавляется смесь трихлорметан:изоамиловый спирт, интенсивно встряхиванием-переворачиванием в течение 3 минут достигается получение эмульсии. Полученную эмульсию центрифугируют 10 минут при 13000 g и температуре 4°С для разделения фаз. Водная (верхняя) фаза переносится в 1,5 мл пробирку типа эппендорф свободную от ДНКаз и к ней (водной фазе) повторно добавляется смесь трихлорметан:изоамиловый спирт, интенсивно встряхиванием-переворачиванием в течение 3 минут достигается получение эмульсии. Полученную эмульсию центрифугируют 10 минут при 13000 g и температуре 4°С для разделения фаз. Водная фаза переносится в новую 1,5 мл пробирку типа эппендорф свободную от ДНКаз и к ней добавляется половина объема 5 М раствора хлорида натрия и два объема 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 13000 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) - отмывка осадка ДНК проводится при 13000 g и 4°С в течение 10 минут. Надосадочная жидкость удаляется и к осадку тотальной ДНК для более тщательной очистки ДНК от следов хлорида натрия аккуратно добавляется 800 мкл 95 % этанола. Суспензия центрифугируется при 13000 g и 4°С в течение 10 минут. Супернатант удаляется и осадок высушивается при 65°С до полного исчезновения запаха этанола и ресуспендируется в 100 мкл свободной от ДНКаз воды или

TE-буфере [S, Krishna Murthy & Govindannagari, Rajani & Pandey, Saurabh & Kompelli, Sai & Visarada, KBRs & Kaul, Dr. Tanushri. (2014). A Simple and Efficient Method for High Quality DNA Extraction from Sweet Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench].

Формула изобретения

1. Экстракционный буфер для выделения геномной ДНК из растительного материала сорго (*Sorghum* sp.), включающий 100 мМ трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорида pH 8,0, цетилтриметиламмония бромид, 2-сульфанилэтан-1-ол, динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0, хлорид натрия, отличающийся тем, что концентрация цетилтриметиламмония бромида 4%, 2-сульфанилэтан-1-ола 5%, динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0 5 мМ, хлорида натрия 2,2 М, также содержится 1% поливинилпирролидона с молекулярной массой 40 кДа.

2. Способ получения экстракционного буфера по п. 1, включающий растворение 0,168 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 4 г цетилтриметиламмония бромида, 12,857 г хлорида натрия, 1 г поливинилпирролидона с молекулярной массой 40 кДа, 5 мл 2-сульфанилэтан-1-ола и доведение объема готового раствора до 100 мл свободной от ДНКаз водой.