



УДК 577.2.08

ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF METHODS FOR THE ISOLATION OF DNA FROM PLANTS AND FOOD PRODUCTS

АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК З РОСЛИН ТА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Shpakov O.V. / Шпаков О.В.

student/ студент

Mykolaiv National Agrarian University,

Mykolaiv, Heorhii Gongadze Street 9, 54008

Миколаївський національний аграрний університет,

м. Миколаїв, вулиця Георгія Гонгадзе 9, 54008

Анотація. У статті проведено систематичний аналіз методів виділення ДНК з рослинної сировини та харчових продуктів, що є ключовим етапом у молекулярно-генетичних дослідженнях. Оптимальний вибір методики екстракції ДНК визначає ефективність подальших аналітичних процедур, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) для ідентифікації генетично модифікованих організмів (ГМО), визначення генетичних маркерів або проведення інших біотехнологічних аналізів. Розглянуто основні підходи до виділення ДНК, серед яких методи, що базуються на використанні детергентів, органічних розчинників, гуанідинтіоціанату, аніонообмінних смол та комерційних наборів для автоматизованої екстракції. Проаналізовано вплив основних параметрів процесу, включаючи хімічний склад вихідного біологічного матеріалу, наявність інгібіторів, методи лізису клітин, депротейнізації та очищення ДНК. Проведено порівняльний аналіз ефективності різних підходів, враховуючи такі показники, як кількість і якість отриманої ДНК, швидкість та відтворюваність процедури, а також економічні аспекти використання методик. Особливу увагу приділено методам, які забезпечують високу чистоту ДНК для подальшого застосування в кількісних та якісних молекулярно-генетичних аналізах, зокрема в реальному часі (qPCR). Окремо розглянуто методологічні особливості виділення ДНК із специфічних типів сировини, таких як олійні культури, зернові, бульбоплоди та перероблені харчові продукти, що містять ГМО-компоненти. Обґрунтовано переваги та недоліки різних підходів для екстракції ДНК із сировини з високим вмістом полісахаридів, жирів та білків, що можуть інгібувати подальші молекулярні дослідження. Результати дослідження підтверджують важливість вибору відповідної методики виділення ДНК залежно від складу вихідного матеріалу та цілей аналізу.

Ключові слова: виділення ДНК, рослинна сировина, харчові продукти, генетично модифіковані організми (ГМО), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), екстракція ДНК, лізис клітин, детергенти, гуанідинтіоціанат, депротейнізація, іонообмінні смоли, qPCR (кількісна ПЛР), чистота ДНК, комерційні набори, аніонообмінна смола, біотехнологічний аналіз, очищення ДНК, інгібітори ПЛР, центрифугування, хімічні реагенти.

Вступ.

Сучасний розвиток молекулярно-генетичних досліджень вимагає ефективних методів виділення ДНК із різних біологічних матеріалів. Особливу увагу привертають методики екстракції ДНК із рослинної сировини та харчових



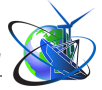
продуктів, оскільки їх якість суттєво впливає на точність подальших аналізів, зокрема при виявленні генетично модифікованих організмів (ГМО). Виділення ДНК є базовим етапом багатьох досліджень у сфері біотехнології, криміналістики, фармації та харчової промисловості, а також є необхідною умовою для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та інших методів молекулярного аналізу.

Значне поширення ГМО у сільському господарстві та харчовій промисловості зумовило необхідність створення надійних аналітичних методик для їх детекції. Використання молекулярних методів, зокрема ПЛР та кількісної ПЛР у реальному часі (qPCR), вимагає високоякісної ДНК без домішок, які можуть інгібувати ампліфікацію. Через це дослідження методів виділення ДНК є актуальним напрямом, спрямованим на оптимізацію процесів екстракції, підвищення виходу та чистоти нуклеїнових кислот.

Методи екстракції ДНК поділяються на кілька основних груп: використання детергентів і протеїназ (наприклад, додецилсульфат натрію та протеїназа К), осадження ДНК спиртами, застосування аніонообмінних смол (Chelex-100), а також використання комерційних наборів для автоматизованої екстракції. Кожен із методів має свої переваги й обмеження, які визначають їх доцільність залежно від типу досліджуваного матеріалу [9].

Основними критеріями ефективності методу виділення ДНК є вихід нуклеїнової кислоти, ступінь її чистоти, швидкість проведення процедури, економічність та можливість застосування для різних типів біологічних зразків. Важливим аспектом є також усунення можливих інгібіторів, що можуть впливати на точність подальших молекулярних досліджень.

Таким чином, актуальність дослідження методів виділення ДНК із рослинної сировини та харчових продуктів зумовлена необхідністю покращення якості та ефективності процедур екстракції, що має важливе значення для контролю безпечності продуктів, виявлення ГМО, а також проведення широкого спектру генетичних досліджень.



Основна частина

Якість екстрагованої ДНК безпосередньо впливає на точність і відтворюваність молекулярно-генетичних досліджень, зокрема на ефективність полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Оптимальний метод екстракції ДНК має враховувати фізико-хімічні особливості біологічного матеріалу, наявність інгібіторів та забезпечувати отримання чистої і стабільної нуклеїнової кислоти.

Метод виділення ДНК повинен бути безпечним, мінімізувати використання токсичних реагентів, а також бути оперативним, забезпечуючи швидке отримання зразків без втрати якості. Надійність, економічність, відтворюваність та автоматизованість також є ключовими критеріями ефективності методу. Висока чистота ДНК необхідна для усунення інгібіторів, що можуть негативно впливати на подальші дослідження.

Процес виділення ДНК базується на лізисі клітин, видаленні мембранних та білкових компонентів. Методи, що використовують детергенти та органічні розчинники, включають додецилсульфат натрію (SDS) або Тритон X-100 у поєднанні з протеолітичними ферментами, такими як протеїназа К. Для депротеїнізації застосовується хлороформ або ізоаміловий спирт, а осадження ДНК здійснюється ізопропанолом або етанолом. Метод забезпечує високу якість ДНК, однак потребує використання потенційно токсичних розчинників [13].

Методи на основі хаотропних агентів застосовують речовини, такі як гуанідинтіоціонат, які руйнують клітинні мембрани та денатурують білки. ДНК адсорбується на твердофазному носії (нуклеосорбенті), а потім елююється. Ці методи добре підходять для автоматизації, але можуть залишати сліди гуанідинтіоціонату, що інгібують ПЛР.

Методи із застосуванням аніонообмінних смол, наприклад Chelex-100, полягають у кип'ятінні зразка в присутності іонообмінного сорбенту, що дозволяє видалити металовмісні домішки та білки. Метод простий і не потребує агресивних хімікатів, але висока температура може частково деградувати ДНК.

Методи осадження солями ґрунтуються на взаємодії ДНК із високомолекулярними сполуками у присутності солей, наприклад, ацетату



калію. В результаті ДНК осаджується ізопропанолом, що дозволяє отримати достатній вихід нуклеїнової кислоти без використання органічних розчинників [2].

Останнім часом для екстракції ДНК широко застосовують комерційні набори, що містять готові реагенти та спеціальні носії для сорбції ДНК. Вони дозволяють стандартизувати процедуру та мінімізувати контамінацію, забезпечуючи високу чистоту нуклеїнової кислоти. Однак основним їхнім недоліком є висока вартість витратних матеріалів.

Кожен із методів має свої переваги та обмеження, і вибір оптимального підходу залежить від типу досліджуваного матеріалу, необхідного рівня очищення та доступних ресурсів лабораторії.

Для виділення та очищення ДНК із рослинного матеріалу використовується широкий спектр методів, вибір яких визначається необхідною якістю отриманого препарату та специфікою досліджуваного зразка. Оскільки в багатьох випадках молекулярно-генетичні аналізи, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), не потребують високоочищених препаратів ДНК, можуть застосовуватися більш спрощені та швидкі методи екстракції. Допускається наявність певних домішок, якщо вони не чинять значного впливу на якість аналізу, що дозволяє скоротити час і ресурси, необхідні для підготовки зразків.

Для більшості рослинних матеріалів, зокрема насіння кукурудзи, ріпаку, калюсних тканин та коренеплодів, найбільш ефективним методом екстракції ДНК є використання високих концентрацій хлористого натрію при температурі 75–80 °С. Головною перевагою цього підходу є можливість уникнення токсичних органічних розчинників, таких як фенол і хлороформ, що значно спрощує процедуру. Недоліком є наявність низькомолекулярної РНК у виділеній ДНК, що незначно впливає на більшість ПЛР-аналізів, проте може маскувати короткі амплікони. Для усунення цього ефекту необхідна додаткова обробка РНКазою [7].

Для сої, яка містить високий рівень жирів, ефективнішим є метод із



використанням цетилтриметиламоніюброміду (ЦТАБ) у поєднанні з протеїназою К. Завдяки детергентним властивостям ЦТАБ відбувається видалення жирів, що покращує якість екстрагованої ДНК. Додавання протеїнази К сприяє глибшому очищенню зразка від білкових домішок.

Характеристики проаналізованих методів виділення ДНК з рослинного матеріалу подано в таблиці 1.

Виділення ДНК із харчових продуктів є важливим етапом у молекулярно-генетичних дослідженнях, особливо для ідентифікації генетично модифікованих організмів (ГМО) або контролю автентичності продуктів. Харчові продукти можуть містити значну кількість білків, жирів, полісахаридів та інших домішок, що ускладнюють процес екстракції. Тому використовуються різні методи, адаптовані до специфічного складу досліджуваного матеріалу. Основні підходи до виділення ДНК включають використання детергентів, солей, лужних буферів або специфічних реагентів для руйнування клітинних структур та видалення домішок [4].

Для м'ясо-ковбасних виробів оптимальним є також ЦТАБ-метод, який ефективно видаляє білкові та жирові компоненти, забезпечуючи високу чистоту ДНК. Однак метод має багатоступеневий процес очищення, що подовжує час обробки зразка.

Характеристики проаналізованих методів виділення ДНК з харчових продуктів подано в таблиці 2.

Для молочних продуктів, що містять сою або білкові добавки (сухе молоко, дитяче харчування, штучні сири), найкращим є метод із використанням гуанідинтіоціонату. Він забезпечує ефективне руйнування білкових структур та отримання високоочищеної ДНК, придатної для ПЛР. Проте залишкові сліди гуанідинтіоціонату можуть інгібувати ПЛР, тому потрібні додаткові етапи промивання [14].



Таблиця 1-Оцінка методів виділення ДНК з рослинного матеріалу

Метод	Кількість екстрагрованої ДНК	Ступінь деградації препарату	Тривалість процедури	Трудомісткість	Термін зберігання ДНК	Безпечність	Надійність	Рентабельність	Мінімальна кількість етапів та процедур зміни пробірок	Достовірність та відтворюваність результатів	Можливість роботи з різними біологічними об'єктами	Можливість автоматизування	Валідація результатів	Джерело літератури
Іонообмінна смола Chelex-100	середня	низька	швидка	низька	короткий	так	так	висока	3	так	так	ні	так	[2,9]
Протеїназа К	висока	висока	довга	висока	довгий	ні	так	низька	7	так	так	ні	так	[10,11]
Сорбент SiO ₂	висока	висока	довга	висока	довгий	ні	так	низька	6	так	так	так	так	[10,11]
Комерційні набори (ЗАО 'Синтол')	висока	висока	довга	висока	довгий	так	так	низька	5	так	так	так	так	[5,12]
Комерційні набори (R-BiopharmAG)	висока	висока	довга	висока	довгий	так	так	низька	5	так	так	так	так	[5,6]
Сольовий буфер з SDS	висока	висока	довга	висока	довгий	ні	так	висока	3	так	так	ні	так	[1]

Авторська розробка



Таблиця 2-Оцінка методів виділення ДНК з харчових продуктів

Метод	Кількість екстрагрованої ДНК	Ступінь деградації препарату	Тривалість процедури	Трудомісткість	Термін зберігання ДНК	Безпечність	Надійність	Рентабельність	Мінімальна кількість етапів та процедур зміни пробірок	Достовірність та відтворюваність результатів	Можливість роботи з різними біологічними об'єктами	Можливість автоматизування	Валідація результатів	Джерело літератури
Буфер з високою концентрацією солі	висока	висока	довга	висока	довгий	так	так	висока	3	так	так	так	так	[1,8]
Буфер із середньою концентрацією солі без детергентів	низька	висока	середня	середня	довгий	так	так	висока	4	так	так	так	так	[1,8]
Буфер із низькою іонною силою + протеїназа К	висока	висока	довга	висока	довгий	так	так	низька	6	так	так	ні	так	[3,14]
Chelex-100 (100 °C)	низька	низька	швидка	середня	короткий	ні	ні	висока	3	ні	ні	ні	ні	[3,14]
Лужний метод (NaOH)	висока	низька	швидка	середня	короткий	ні	ні	низька	3	ні	ні	ні	ні	[3]
Метод із ЦТАБ	висока	висока	довга	висока	довгий	ні	так	низька	7	так	так	так	так	[3]

Авторська розробка



Висновки.

Якість та чистота отриманої ДНК є ключовими факторами, що визначають успішність молекулярно-генетичних досліджень, зокрема ампліфікації у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Вибір методики екстракції ДНК має враховувати фізико-хімічні характеристики досліджуваного зразка, його вміст білків, жирів, полісахаридів та інших домішок, а також можливу наявність інгібіторів, що можуть впливати на ефективність подальших досліджень.

Для екстракції ДНК із сої, яка містить високий рівень жирів, найкращі результати були досягнуті при використанні цетилтриметиламонію броміду (ЦТАБ) у поєднанні з протеїназою К. Подібний підхід виявився найбільш ефективним і при виділенні ДНК із м'ясо-ковбасних виробів, оскільки забезпечує отримання високоочищеної ДНК, придатної для подальших досліджень.

Для молочних продуктів, що містять соєві домішки (наприклад, сухе молоко, дитяче харчування, штучні сири), найбільш ефективним методом екстракції ДНК виявилось використання гуанідинтіоціонату.

Порівняння двох комерційних систем екстракції ДНК, які широко застосовуються для детекції ГМО, свідчать, що обидві методики забезпечують достатню якість ДНК для подальших ПЛР-досліджень, а відмінності в способі очищення та підготовки зразків можуть впливати лише на тривалість процедури та ступінь очищення нуклеїнової кислоти.

Таким чином, вибір методу екстракції ДНК має базуватися на типі досліджуваного зразка та меті дослідження. Традиційні методи, такі як ЦТАБ або хлористий натрій, залишаються ефективними та широко застосовуваними, тоді як комерційні системи екстракції ДНК дозволяють стандартизувати процес та зменшити вплив людського фактора.

Подальші дослідження повинні бути спрямовані на вдосконалення методів виділення ДНК, зокрема оптимізацію процесів очищення для різних типів сировини, а також на підвищення чутливості та точності молекулярних методів контролю ГМО.



Література:

1. Блюм Я., Банникова М., Карпов П. Впровадження методів оцінки наявності та вмісту генетично модифікованих компонентів у продуктах харчування, кормах і парфюмерно-косметичних виробах. *Наука та інновації*. 2008. Т. 4, № 2. С. 40–48.
2. Використання ДНК-аналізу у судово-медичних експертизах речових доказів та експертизах спірного батьківства (материнства, підміни дітей) : Метод. рек. Київ : Нац. мед. акад. післядиплом. освіти ім. П.Л.Шупика Держ. установа Головне бюро судово-мед. експертизи МОЗ України Од. нац. мед. Ун-т, каф. суд. медицини та мед. законодавства Дніпропетровськ, 2012. 32 с.
3. Димань Т., Димань Н. Використання ДНК-технологій для експертизи харчових продуктів. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва збірник наукових праць*. 2023. № 2. С. 90–99.
4. Кушнір Г. В. Контроль безпечності рослинної сировини за показником ГМО. Порівняння методик виділення ДНК. *Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок*. С. 265–271.
5. Любинський О. І. Сучасні методи виявлення генетично модифікованих організмів рослин і продукції. *Вісник кам'янець-подільського національного університету імені Івана Огієнка*. 2018. № 3. С. 114.
6. Мінаєва Ю. Визначення ГМО в продуктах харчування методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. *МАТЕРІАЛИ II Регіональної науково-практичної конференції “Екологічні проблеми сучасності та шляхи їх вирішення”*. С. 135–140.
7. Облап Р. В., Димань Т. М., Новак Н. Б. Моніторинг харчових продуктів та продовольчої сировини на наявність генетично модифікованої сої лінії GTS 40-3-2. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2013. № 1. С. 125–129.
8. Облап Р., Новак Н., Димань Т. Ідентифікація генетично модифікованої кукурудзи лінії MON 810 у продовольчій сировині та харчових продуктах



методом ПЛР-РЧ. С. 8–11.

9. Палькіна М. Д., Метлицька О. І. Оптимізація методів виділення днк з біологічного матеріалу бджіл різних стадій метаморфозу. *Розведення і генетика тварин*. 2016. № 52. С. 171.

10. Пірко Я., Корховий В., Кашеваров Г. Впровадження методів контролю генетично модифікованих компонентіву насіннєвому матеріалі сільськогосподарських культур та стандартизація їх нормативного забезпечення. *Наука та інновації*. 2009. Т. 5, № 2. С. 38–49.

11. Россоха В., Руденко Є., Шкавро Н. Створення, детекція та оцінка генетично модифікованих організмів (оглядова). *Науково-технічний бюлетень No100*. Харків, 2009. С. 416–421.

12. Спиридонов В. Г., Іщенко Л. М., Мельничук С. Д. Валідація методики якісного та кількісного валідація методики якісного та кількісного Визначення генетично модифікованих визначення генетично модифікованих Зернових культур методом полімеразної зернових культур методом полімеразної Ланцюгової реакції у реальному часі. *Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК, Національний університет біоресурсів і природокористування України*. С. 96–101.

13. A comparative analysis of different DNA extraction methods for fish tissues / T. M. Dyman et al. *Tehnologîa virobniçtva i pererobki produktiv tvarinnictva*. 2023. No. 1(178). P. 97–104. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-9289-2023-178-1-97-104> (date of access: 14.02.2025).

14. Oblap R., Novak N., Dyman T. Monitoring of food, feed, agricultural raw material for genetically modified ingredients in Ukraine. *Bioresursi i prirodokoristuvannâ*. 2018. Vol. 10, no. 3-4. URL: <https://doi.org/10.31548/bio2018.03.006> (date of access: 16.02.2025).

Abstract. The article presents a systematic analysis of methods for DNA extraction from plant materials and food products, which is a key step in molecular genetic research. The optimal choice of DNA extraction methodology determines the effectiveness of further analytical procedures, such as polymerase chain reaction (PCR) for the identification of genetically modified organisms (GMOs), determination of genetic markers or other biotechnological analyses. The main approaches to DNA



extraction are reviewed, including methods based on the use of detergents, organic solvents, guanidinium thiocyanate, anion exchange resins, and commercial kits for automated extraction. The influence of the main process parameters, including the chemical composition of the starting biological material, the presence of inhibitors, methods of cell lysis, deproteinisation and DNA purification, was analysed. A comparative analysis of the effectiveness of different approaches is carried out, taking into account such indicators as the quantity and quality of the obtained DNA, the speed and reproducibility of the procedure, as well as the economic aspects of the methods. Particular attention is paid to methods that ensure high DNA purity for further use in quantitative and qualitative molecular genetic analyses, in particular, real-time qPCR. The methodological features of DNA extraction from specific types of raw materials, such as oilseeds, cereals, tubers and processed foods containing GMO components, are considered separately. The advantages and disadvantages of different approaches for DNA extraction from raw materials with a high content of polysaccharides, fats and proteins, which may inhibit further molecular studies, are discussed. The results of the study confirm the importance of choosing an appropriate DNA extraction technique depending on the composition of the starting material and the purpose of the analysis.

Keywords: DNA extraction, plant material, food products, genetically modified organisms (GMOs), polymerase chain reaction (PCR), DNA extraction, cell lysis, detergents, guanidinium thiocyanate, deproteinisation, ion exchange resins, qPCR (quantitative PCR), DNA purity, commercial kits, anion exchange resin, biotechnological analysis, DNA purification, PCR inhibitors, centrifugation, chemical reagents.

Науковий керівник: к. техн. наук, доцентка Юлевич О.І.

Стаття відправлена: 19.02.2025 р.

© Шпаков О.В.