

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА МАРАЛОВ

Лубенникова Марина Владимировна, кандидат сельскохозяйственных наук

Афанасьев Константин Александрович, кандидат ветеринарных наук

Афанасьев Виктор Александрович, кандидат ветеринарных наук

ФГБНУ ФАНЦА (отдел ВНИИПО)

656031, г. Барнаул, ул. Шевченко, 160. Тел. (3852) 50-13-40. E-mail: wniipo@rambler.ru

Ключевые слова: ДНК, выделение, метод, ткань, кровь, ген.

Основной задачей мараловодства продолжает оставаться увеличение производства пантов. Применение молекулярно-генетических методов в селекции маралов способствует повышению надежности и достоверности оценки продуктивности и племенной ценности маралов-рогачей в раннем возрасте. Цель исследований: апробировать методики выделения ДНК из биологического материала маралов. Отобран биоматериал от маралов-рогачей алтае-саянской породы (кровь, крошка пантов, хрящевая ткань ушных раковин). Работа по выделению ДНК из образцов тканей марала была проведена в лаборатории биоинженерии на базе Алтайского государственного университета (г. Барнаул). Выделение ДНК проводилось с помощью метода, основанного на использовании препарата хелатирующего реагента Chelex-100 TM Resin (Bio-Rad, США), метода на основе преципитации ДНК Diamond DNA (ООО «АБТ», Россия) и коммерческого кита на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США). Степень очистки выделенной ДНК оценивали по эффективности прохождения ПЦР в реакциях амплификации генов цитохром оксидазы 1, цитохрома В митохондриальной ДНК. Наибольшая концентрация ДНК марала установлена при выделении основанном на преципитации ДНК (Diamond DNA). Концентрация ДНК в растворе составила 13,20 нг/мкл (кровь), 11,30 нг/мкл (хрящевая ткань), 5,74 нг/мкл (пантовая крошка).

Введение

Главной продукцией пантового оленеводства являются панты – молодые неокостеневшие рога [1-5]. Они имеют трубчатую неороговевшую структуру, наполненную кровью. Панты пронизаны сосудами и нервами, покрыты тонкой бархатистой кожей с коротким мягким волосяным покровом [6-7].

В своей основе панты являются биологически активными веществами, широко применяемыми в медицинской практике нашей страны и вызывающими возрастающий интерес в зарубежных странах [8-11].

Практический опыт мараловодства доказывает возможность воздействовать на продуктивные качества животных в процессе хозяйственного использования. Наиболее важными факторами здесь служат технология содержания, кормление, селекционно-племенная работа [12].

Традиционные методы оценки животных на современном этапе не могут в полной мере удовлетворять требованиям, предъявляемым к селекции, поэтому в последнее время все больше внимания уделяется изучению методов молекулярной генетики.

В молекулярной генетике практически все научные исследования включают этап выделения нуклеиновых кислот. Выделение ДНК является первым и очень важным этапом молекулярно-генетического исследования. От качества

выделенной ДНК зависит успех всех последующих этапов исследования. Неправильный выбор метода выделения ДНК или его неверное осуществление могут привести либо к получению загрязненной ДНК, непригодной для исследования, либо её потере [13].

Большинство современных методов выделения ДНК из тканей животного происхождения состоят из следующих этапов: лизиса клеток и ядра; удаления из полученного материала ингибиторов; инактивации клеточных нуклеаз; отделения искомым нуклеиновых кислот от клеточной массы; очистки и концентрирования ДНК [14].

Цель исследований: апробировать методики выделения ДНК из биологического материала маралов.

Задачи:

- сравнить эффективность выделения ДНК из разного биоматериала маралов;

- определить наиболее оптимальный метод выделения ДНК из образцов тканей маралов;

- оценить степень очистки выделенной ДНК.

Материалы и методы исследований

В июне-июле 2021 года был отобран биоматериал от маралов-рогачей алтае-саянской породы. В качестве биоматериала были взяты: кровь, крошка пантов, хрящевая ткань ушных раковин.



Рис. 1 - Маралы-рогачи алтае-саянской породы

Работа по выделению ДНК из образцов тканей марала была проведена в лаборатории биоинженерии на базе Алтайского государственного университета (г. Барнаул).

Выделение ДНК проводилось с помощью широко распространенного в криминалистике метода с использованием препарата хелатирующего реагента Chelex-100 TM Resin (Bio-Rad, США), метода на основе преципитации ДНК Diamond DNA (ООО «АБТ», Россия) и коммерческого кита на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США).

Исследуемые образцы биоматериала были взяты в следующих количествах: 10 мкл крови, 10 мг пантовой крошки, 10 мг хрящевой ткани. Объем ТЕ-буфера для растворения очищенной ДНК составлял 100 мкл. Концентрацию ДНК в растворе измеряли с использованием флуориметра MaxLife (ООО «МВМ Диагностика», Россия).

Степень очистки выделенной ДНК оценивали по эффективности прохождения ПЦР в реакциях амплификации генов цитохром оксидазы 1, цитохрома В митохондриальной ДНК. Амплификация проведена на амплификаторе CFX-96 (Bio Rad, США).

Амплификация генов цитохром оксидазы 1, цитохрома В проводилась по следующей оптимизированной программе: 1 цикл: 95 °C – 180 сек; 35 циклов: 95 °C – 15 сек, 57 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек; завершающая стадия: 72 °C – 5 мин. ПЦР проведена с использованием 2x qPCR hot-start SibrGreen mix Biolabmix LLC (Россия) с использованием праймеров для гена COX I F3 5'-CAACACTTGTCTGATTCTTCGG-3' и R3 5'-GGGGGTTTCGATTCCTTCCTTTC-3'. Праймеры для амплификации Cyt b: F 5-TTYGCATACGCAGCAATCYTACGATC-3 и R

5-GTTGKCCTCCRATTCATGTRAG-3.

Результаты исследований

В настоящее время существует большое количество специализированных методик, которые могут применяться для выделения нуклеиновых кислот с высокой степенью очистки (с помощью органических растворителей, силики (диоксид кремния), гель-фильтрации, магнитных частиц микроцентрифужных колонок, бумажных фильтров, ионообменной смолы (Chelex) и т.д.).

В ходе работы проведено сравнение эффективности выделения и очистки ДНК из образцов тканей марала с помощью разных методик и коммерческих наборов (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение эффективности выделения ДНК из образцов тканей марала с помощью разных методов и коммерческих наборов

Материал	Способ выделения	Флуориметр MaxLife	ПЦР, Cq	
		Конц., нг/мкл	CO1	CytB
Кровь	Diamond DNA	13,20	+	+/-
	Chelex 100	1,02	+	+
	Магнитные частицы	0,56	+	+
Пантовая крошка	Diamond DNA	5,74	+	+
	Chelex 100	1,00	-	-
	Магнитные частицы	0,88	+	+
Хрящевая ткань	Diamond DNA	11,30	+/-	+
	Chelex 100	2,03	-	-
	Магнитные частицы	3,84	+/-	+

Примечание: «+» – реакция амплификации прошла успешно; «-» – реакция амплификации не прошла; «+/-» – в ходе реакции получена низкая концентрация ампликонов.

Выделение ДНК из животных тканей и их дериватов с помощью Diamond DNA основывается на лизисе тканей в лизирующем буфере (SDS-метод), сорбции ингибиторов ферментативных реакций из раствора с помощью специального селективного сорбента и осаждении ДНК из раствора с помощью высокоэффективного буфера для осаждения ДНК.

Выделение ДНК с помощью Chelex основано на кипячении образца в 5% суспензии Chelex, представляющей собой хелатирующую смолу, которая имеет высокое сродство к ионам поливалентных металлов. Смола Chelex состоит

из стиролдивинилбензолных сополимеров, содержащих парные ионы, которые действуют как хелатные группы. Присутствие Chelex во время кипения предотвращает деградацию ДНК хелатными ионами металлов, которые могут выступать в роли катализаторов при распаде ДНК при высоких температурах в растворах с низкой ионной силой. Щелочность суспензий Chelex (рН 10-11) и воздействие температуры 100 °С приводят к разрушению клеточных мембран и денатурации ДНК. Для последующей амплификации с помощью ПЦР используется фракция супернатанта [15, 16].

Выделение ДНК на магнитных частицах AMPure XP основано на связывании ДНК с магнитными частицами, последующей сепарации ДНК, связанных с магнитными частицами, от примесей, и элюирование ДНК от магнитных частиц [17].

В результате проведенного анализа выявлено, что наибольшая концентрация ДНК характерна для выделения, основанного на преципитации ДНК (Diamond DNA). Концентрация ДНК в растворе составила 13,20 нг/мкл (кровь), 11,30 нг/мкл (хрящевая ткань), 5,74 нг/мкл (пантовая крошка).

При оценке степени очистки ДНК, выделенной из крови с помощью Diamond DNA, в ходе реакции амплификации гена цитохрома В, а также гена цитохрома В и цитохром оксидазы 1 (выделение с помощью Chelex и магнитных частиц AMPure XP) установлено, что реакция амплификации прошла успешно. Оценка степени очистки выделенной с помощью Diamond DNA и магнитных частиц AMPure XP ДНК из пантовой крошки, в ходе реакции амплификации гена цитохрома В и цитохром оксидазы 1, и ДНК полученной из хрящевой ткани с помощью Diamond DNA, в ходе реакции амплификации гена цитохрома В, также дала положительный результат.

В ходе оценки степени очистки выделенной ДНК с помощью Diamond DNA из крови в процессе реакции амплификации гена цитохрома В, а также гена цитохром оксидазы 1, выделенного из хрящевой ткани с помощью Diamond DNA и магнитных частиц AMPure XP, была получена низкая концентрация ампликонов. Реакция амплификации генов цитохром оксидазы 1 и цитохрома В митохондриальной ДНК выделенной с помощью Chelex из пантовой крошки и хрящевой ткани не прошла.

Обсуждение

В молекулярной генетике выбор метода выделения нуклеиновых кислот остается труд-

ной задачей, от решения которой зависит получение правильного и надежного результата. На сегодняшний день имеется большое количество специализированных методик, применяемых для выделения нуклеиновых кислот с высокой степенью очистки (с помощью органических растворителей, силики (диоксид кремния), гель-фильтрации, бумажных фильтров, ионообменной смолы и т.д.).

Нами проведена работа по апробации ряда методик выделения ДНК из разного биоматериала маралов с последующей количественной и качественной оценкой.

Заключение

- выделена ДНК с помощью препарата хелатирующего реагента Chelex-100 TM Resin на основе преципитации ДНК Diamond DNA и коммерческого кита на магнитных частицах AMPure XP;

- наибольшая концентрация ДНК марала характерна для выделения, основанного на преципитации ДНК, что подтверждалось количественной и качественной оценкой;

- концентрация ДНК в исследуемых растворах составила 13,20 нг/мкл (кровь), 11,30 нг/мкл (хрящевая ткань), 5,74 нг/мкл (пантовая крошка).

Библиографический список

1. Фролов, Н. А. Повышение эффективности развития пантового оленеводства (на материалах хозяйств пантового оленеводства Республики Алтай): спец. 08.00.05 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата экономических наук / Фролов Николай Алексеевич ; Алтайский государственный университет. – Барнаул, 2006. – 26 с.
2. Возможности использования продуктов пантового оленеводства для профилактики заболеваний и реабилитации пациентов / Ю. В. Бобрик, В. Н. Шпаковский, А. А. Дружков [и др.] // Вестник терапии и курортологии. – 2018. – № 1. – С. 103-104.
3. Бочаров, С. Н. Нужно ли объединение в пантовом оленеводстве? / С. Н. Бочаров, А. П. Попов // ЭКО. – 2007. – № 8(398). – С. 106-118.
4. Попов, А. П. Роль инноваций в развитии отрасли пантового оленеводства Республики Алтай / А. П. Попов, А. Ю. Тарасова // Аграрно-экономическая наука о проблемах инновационного развития агропромышленного производства : материалы I Международной научно-практической конференции. В 2-х частях. – Омск : ФГБОУ ВПО Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, 2007. – С. 73-76.

5. Исламова, А. А. История пантового оленеводства в России / А. А. Исламова, А. В. Степанов // Молодежь и наука. – 2019. – № 3. – С. 26.

6. Есмуханбетов, Д. Н. Продуктивно-биологические качества алтайских маралов в Заилийском Алатау (Северный Тянь-Шань) : спец. 06.02.19 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Есмуханбетов Данияр Нуридинович ; Российский государственный аграрный заочный университет. – Иркутск, 2013. – 139 с.

7. Эндокринная регуляция роста и развития организма оленевых : монография / Н. Д. Овчаренко, Л. А. Бондырева, О. Г. Грибанова [и др.]. – Барнаул : Издательство АГАУ, 2010. – 174 с. – ISBN 978-5-94485-171-0.

8. Иванкина, Н. Ф. Функциональная пищевая добавка вторичного сырья пантового оленеводства для обогащения кондитерских изделий / Н. Ф. Иванкина, Е. И. Решетник, Н. А. Фролова // Дальневосточный аграрный вестник. – 2013. – № 4. – С. 48-51.

9. Чернова, И. В. Панты и кровь в народной медицине населения Саяно-Алтайского региона в конце XIX-XX вв. / И. В. Чернов // Известия Алтайского государственного университета. – 2009. – С. 250–252.

10. Попова, И. С. Исследование факторов, формирующих спрос и предложение на розничном рынке БАД к пище, изготовленных на основе сырья пантового оленеводства / И. С. Попова, Е. Ф. Шарахова // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2017. – № 1. – С. 88-92.

11. Кроневальд, О. В. Ветеринарно-санитарная и товарная характеристика пантовой и побочной продукции маралов / О. В. Кроневальд, Н. Е. Борисенко // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. – № 7. – С. 82-83.

12. Закономерности развития маралов в постнатальном онтогенезе / В. М. Жуков, Н. М. Бессонова, Н. С. Петрусева [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2010. – № 10(72). – С. 65-71.

13. Великов, В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство: учебное пособие / В. А. Великов. – Саратов : Саратовский источник, 2013. – 84 с. – ISBN 978-5-91879-250-6.

14. Каюмов, А. Р. Практикум по молекулярной генетике : учебно-методическое пособие / А. Р. Каюмов, О. А. Гимадудинов. – Казань, 2016. – 36 с.

15. Walsh, P. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material / P. Walsh, D. Metsger, R. Higuchi // BioTechniques. – 2018. - № 54(3). – P.134–139.

16. Перепечина, И. О. Исследование объектов судебно-биологической экспертизы полимеразной цепной реакцией : методические рекомендации / И. О. Перепечина, М. Г. Пименов, Т. В. Стегнова. – Москва : ЭКЦ МВД России, 1996. – 24 с.

17. Rapid Universal Method to Isolate PCR-Ready DNA Using Magnetic Beads / K. Rudi, M. Kroken, O. J. Dahlberg, A. Deggerdal, K. S. Jakobsen, F. Larsen // BioTechniques. – 1997. – № 22. – P. 506–511.

DNA ISOLATION FROM BIOLOGICAL MATERIAL OF MARALS

Lubennikova M.V., Afanasiev K.A., Afanasiev V.A.

Federal State Budgetary Scientific Institution "Altai Scientific Center of Agricultural Biotechnology"

(Department of "All-Russian Research Institute of Reindeer Antler Breeding"),

656031, Barnaul, Shevchenko st., 160.Tel. (3852)50-13-40. E-mail: wniipo@rambler.ru

Key words: DNA, isolation, method, tissue, blood, gene.

The main task of maral breeding is production increase of antlers. Application of molecular genetic methods in maral breeding contributes to increase in reliability and accuracy of assessment of productivity and breeding value of stag deer at an early age. The purpose of the research is to test methods DNA isolation from biological material of marals. The biomaterial was selected from stag deer of Altai-Sayan breed (blood, antler crumbs, cartilaginous tissue of the auricles). The work on DNA isolation from maral tissue samples was carried out in the bioengineering laboratory at Altai State University (Barnaul). DNA isolation was conducted using the method based on application of Chelex-100™ Resin chelating agent (Bio-Rad, USA), the method based on DNA precipitation Diamond DNA (OOO ABT, Russia) and commercial kit based on magnetic particles AMPure XP (Beckman Coulter, USA). The purification degree of the isolated DNA was assessed by PCR efficiency in reactions of amplification of the genes of cytochrome oxidase 1, cytochrome B of mitochondrial DNA. The highest concentration of maral DNA was established in isolation based on DNA precipitation (Diamond DNA). The concentration of DNA in the solution was 13.20 ng/μl (blood), 11.30 ng/μl (cartilaginous tissue), 5.74 ng/μl (antler crumbs).

Bibliography:

1. Frolov, N. A. Efficiency increase of antler deer breeding development (on the materials of antler deer breeding farms in the Altai Republic): spec. 08.00.05 : abstract of the dissertation for the degree of candidate of economic sciences / Frolov Nikolay Alekseevich ; Altai State University. - Barnaul, 2006. - 26 p.

2. Possibilities of using deer antler products for disease prevention and recovery of patients / Yu. V. Bobrik, V. N. Shpakovsky, A. A. Druzhkov [and others] // Vestnik of Therapy and Health resort study. - 2018. - № 1. - P. 103-104.

3. Bocharov, S. N. Is it necessary to unite in antler reindeer breeding? / S. N. Bocharov, A. P. Popov // ECO. - 2007. - № 8 (398). - P. 106-118.

4. Popov, A.P. *The role of innovation in development of antler deer breeding industry in the Altai Republic* / A.P. Popov, A.Yu. Tarasova // *Agrarian and economic science about the problems of innovative development of agro-industrial production: materials of the I International Scientific and Practical Conference*. In 2 parts. - Omsk: FSEI HPE Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, 2007. - P. 73-76.
5. Islamova, A. A. *History of antler deer breeding in Russia* / A. A. Islamova, A. V. Stepanov // *Youth and science*. - 2019. - № 3. - P. 26.
6. Esmukhanbetov, D.N. *Productive and biological qualities of the Altai deer in Zailiysky Alatau (Northern Tien Shan): spec. 06.02.19: dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences* / Esmukhanbetov Daniyar Nuridinovich; Russian State Agrarian On-line University. - Irkutsk, 2013. - 139 p.
7. *Endocrine regulation of growth and development of deer organism: monograph* / N. D. Ovcharenko, L. A. Bondyрева, O. G. Gribanova [and others]. - Barnaul: Publishing House of ASAU, 2010. - 174 p. – ISBN 978-5-94485-171-0.
8. Ivankina, N. F. *Functional food additive of secondary raw materials of deer antler breeding for enrichment of confectionery products* / N. F. Ivankina, E. I. Reshetnik, N. A. Frolova // *Far Eastern Agrarian Vestnik*. - 2013. - № 4. - P. 48-51.
9. Chernova, I. V. *Pants and blood in folk medicine of Sayano-Altai region at the end of the 19th-20th centuries.* / I. V. Chernova // *Izvestiya of Altai State University*. - 2009. - P. 250-252.
10. Popova, I. S. *Study of the factors that form demand and supply in retail market of dietary food supplements, made on the basis of raw materials from deer antler breeding* / I. S. Popova, E. F. Sharakhova // *Kursk Scientific and Practical Vestnik Man and his health*. - 2017. - № 1. - P. 88-92.
11. Kronevald, O.V. *Veterinary-sanitary and commercial quality of antler and by-products of marals* / O.V. Kronevald, N.E. Borisenko // *Vestnik of Altai State Agrarian University*. - 2013. - № 7. - P. 82-83.
12. *Patterns of maral development in postnatal ontogenesis* / V. M. Zhukov, N. M. Bessonova, N. S. Petruseva [et al.] // *Vestnik of Altai State Agrarian University*. - 2010. - № 10(72). - P. 65-71.
13. Velikov V. A., *Molecular Biology. Practical guide: textbook* / V. A. Velikov. – Saratov : Saratovskiy istochnik, 2013. - 84 p. – ISBN 978-5-91879-250-6.
14. Kayumov, A. R. *Practice book on molecular genetics: study manual* / A. R. Kayumov, O. A. Gimadutdinov. - Kazan, 2016. - 36 p.
15. Walsh, P. *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material* / P. Walsh, D. Metzger, R. Higuchi // *BioTechniques*. - 2018. - № 54(3). – P.134–139.
16. Perepechina, I. O. *Study of objects of forensic biological examination of polymerase chain reaction: instructional guidelines.* - Moscow: Forensic Science Center of the Ministry of Internal Affairs of Russia, 1996. - 24 p.
17. *Rapid Universal Method to Isolate PCR-Ready DNA Using Magnetic Beads* / K. Rudi, M. Kroken, O. J. Dahlberg, A. Deggerdal, K. S. Jakobsen, F. Larsen // *BioTechniques*. - 1997. - № 22. - P. 506–511.