

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КРОВИ И СПЕРМЫ

**Ахметов Т.М., Тюлькин С.В., Нургалиев Ф.М.**

ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной  
медицины имени Н.Э.Баумана»

**Ключевые слова:** экстрагирование ДНК, амплификация, ПЦР-ПДРФ, аллель, генотип, кровь, сперма.

**Key words:** extraction of DNA, amplification, PCR-RFLP, allele, genotype, blood, semen.

Выявление индивидуальных или видоспецифичных генетических особенностей является комплексной технологической задачей, осложненной тем, что особенности эти могут составлять лишь малую часть генетического материала сравниваемых организмов (вплоть до одного нуклеотида). Поэтому подходы к выполнению такого рода исследований чаще всего, базируются на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющем нарабатывать молекулы ДНК определенной последовательности начиная с минимальных количеств стартового материала (Д.В. Ребриков, 2008).

Открытие Карри Мюллисом в 1983 году (США) метода полимеразной цепной реакции послужило толчком к активному развитию разнообразных технологий амплификации нуклеиновых кислот. По сути, все методы амплификации имитируют природную возможность репликации ДНК. При этом *in vitro* происходит изолированное умножение гена или его фрагментов (амплификация) в миллионы раз (Р.Р. Вафин, 2009).

Всем амплификационным методам предшествует этап выделения нуклеиновых кислот, который предопределяет качество пробоподготовки и успех дальнейших исследований (Т. Маниатис, 1984; К.М. Дейвис, 1990; R. Boom et al., 1990; M. Beld et al., 1996; С. Херрингтон и др., 1999).

Имеется множество методов выделения нуклеиновых кислот, такие как детергентный, фенольный, фенольно-детергентный, а также сорбционные способы экстракции, которые получили широкое распространение благодаря эффективному получению препаратов ДНК приемлемой чистоты и концентрации из биоматериала (Т. Маниатис, 1984; К.М. Дейвис, 1990; R. Boom et al., 1990; M. Beld et al., 1996; С. Херрингтон и др., 1999).

Всё выше сказанное говорит о важности разработки новых методов и оптимизация уже существующих методов выделения ДНК.

**Материалы и методы.** Кровь, получали из яремной вены животных, вносили в пробирки с 100 мМ ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ. Сперма от производителей поступала в замороженном виде.

Выделение ДНК из крови проводили разработанными и оптимизированными нами аммиачным и комбинированным щелочным способом.

Аммиачный способ. 100 мкл крови смешивали с 1000 мкл дистиллированной воды и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 100 мкл 10% раствора аммиака (25-37<sup>0</sup>С) и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95<sup>0</sup>С в течение 15 мин с открытой пробиркой.

Комбинированный щелочной способ. 100 мкл крови смешивали с 1 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 50 мкл 0,2 М NaOH и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 60<sup>0</sup>С в течение 10 мин. К лизату добавляли равный объем (50 мкл) 1М Трис-НСl (рН 8,0) и тщательно встряхивали смесь на вортексте при комнатной температуре. К полученному гомогенату добавляли 500 мкл 96% этанола и выдерживали полученную смесь при -20<sup>0</sup>С в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при 60<sup>0</sup>С в течение 12 мин с открытой пробиркой. К высушенному осадку добавляли 100 мкл 10% аммиака, тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре и выдерживали в термостате при 60<sup>0</sup>С в течение 10 мин, затем повторно встряхивали на вортексе и выдерживали в термостате при 60<sup>0</sup>С в течение 10 мин. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95<sup>0</sup>С в течение 15 мин с открытой пробиркой.

Выделение ДНК из спермы проводили разработанным и оптимизированным нами комбинированным щелочным способом.

Комбинированный щелочной способ. 50 мкл спермы растворяли в 500 мкл дистиллированной воды и осаждали при 10000 об/мин в течение 10 мин. К осадку добавляли 50 мкл лизирующего раствора (100 mM Tris-НСl (рН 8,0), 100 mM EDTA-Na (рН 8,0), 2% SDS, 1 mg/ml протеиназы К, 10 mM 2-меркаптоэтанол), тщательно суспендировали на вортексе и инкубировали при 55<sup>0</sup>С в течение 1 часа, через каждые 15 мин встряхивая на вортексе. К лизату добавляли 50 мкл 0,5 М NaOH и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 55<sup>0</sup>С в течение 30 мин, через каждые 15 мин встряхивая на

вортексе. Добавляли равный объем (50 мкл) 1М Трис-НСl (рН 8,0) и тщательно встряхивали смесь на вортексте при комнатной температуре. Затем смешивали с 500 мкл 96% этанола осторожным покачиванием пробирки и выдерживали полученную смесь в морозильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин с открытой пробиркой. К высушенному осадку добавляли 100 мкл 10% аммиака, тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре и выдерживали в термостате при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин, затем повторно встряхивали на вортексе и повторяли процедуру термостатирования ( $60^{\circ}\text{C}$ , 15 мин). Полученный гомогенат инкубировали в термостате при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин с открытой пробиркой. Препараты ДНК хранили в условиях морозильника. Перед использованием пробы ДНК размораживали в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин.

Для проверки эффективности оптимизированных нами методов выделения ДНК был проведен ПЦР-ПДРФ-анализ гена каппа-казеина. Амплификацию проводили на программируемом термоциклере «Терцик» (Россия) в объеме реакционной смеси 20 мкл, с праймерами JK5 и JK3 (J.F. Medrano, E. Aguilar-Cordova, 1990). Температурный режим амплификации был следующим:  $\times 1$ :  $94^{\circ}\text{C}$  – 4 мин;  $\times 40$ :  $94^{\circ}\text{C}$  – 10 сек,  $63^{\circ}\text{C}$  – 10 сек,  $72^{\circ}\text{C}$  – 10 сек;  $\times 1$ :  $72^{\circ}\text{C}$  – 5 мин; хранение:  $4^{\circ}\text{C}$ .

Для определения аллельного полиморфизма гена каппа-казеина 20 мкл ПЦР пробы обрабатывали 10 ед. эндонуклеазы рестрикции *HinfI* в 1 $\times$ буфере «О» фирмы СибЭнзим (Россия) при  $37^{\circ}\text{C}$  течение ночи.

Для визуализации фрагментов ДНК пробы вносили в лунки 2,5% агарозного геля с содержанием этидия бромид (0,5 мкг/мл) и проводили горизонтальный электрофорез при 15 В/см в течение 50 мин в 1 $\times$ ТВЕ буфере.

После электрофореза гель просматривали в УФ-трансиллюминаторе при длине волны 310 нм.

**Результаты исследований.** Разработанный нами аммиачный способ выделения ДНК из крови крупного рогатого скота является достаточно эффективной техникой пробоподготовки нуклеиновых кислот для ДНК-анализа. Преимуществом этого способа выделения ДНК является простота эксплуатации, и экономичность по времени и средствам. Недостатком же данного способа является то, что полученные препараты нуклеиновых кислот не пригодны для средне- и долгосрочного хранения. Поэтому, в целях обеспечения качественного ДНК-анализа, пробы нуклеиновых кислот целесообразно вносить в реакционную ПЦР смесь в ближайшие 30 минут после выпаривания аммиака.

Нами также предложен комбинированный щелочной способ выделения ядерной ДНК из лейкоцитов крупного рогатого скота, который

позволяет использовать экстрагированные нуклеиновые кислоты для ДНК-диагностики в течение 1 года с более чем 30 кратной заморозкой-разморозкой.

Препараты ДНК из спермы быков-производителей, выделенные оптимизированным нами комбинированным щелочным способом, также показали способность к качественному воспроизведению результата, давая четкую картину амплификации в течение 1 года с более чем 30 кратной заморозкой-разморозкой.

Эффективность выделения ДНК из спермы быков-производителей была достигнута использованием в лизирующем растворе 2-меркаптоэтанола – сульфидредукента, разрушающего дисульфидные связи, что в конечном счете позволяло протеиназе K и SDS довершить процедуру лизиса.

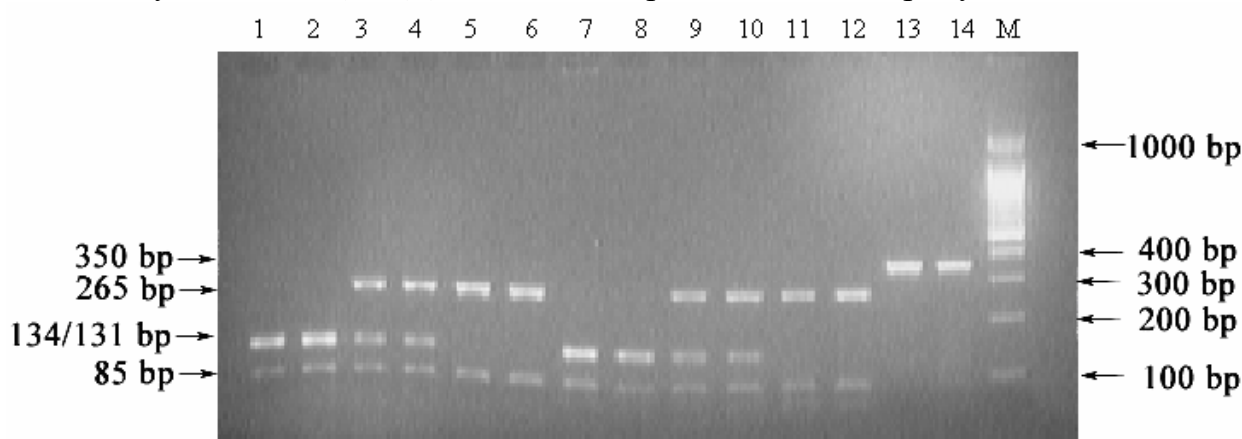
Заключительным этапом комбинированного щелочного способа экстракции ядерной ДНК из лейкоцитов и спермы крупного рогатого скота являлось применение 10% раствора аммиака, использованного в качестве растворителя осажденного нуклеопротеидного комплекса, предварительно экстрагированного NaOH. Выбранный подход растворения нуклеиновых кислот с последующим выпариванием аммиака позволял получать пригодные для молекулярно-генетических исследований препараты ДНК с долгосрочным периодом хранения.

Для оценки предложенных способов выделения наследственного материала из исследуемых биологических объектов (крови и спермы) нами проведено генотипирование крупного рогатого скота по аллелям A и B гена каппа-казеина с использованием пары олигонуклеотидных праймеров:

JK5: 5'-ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3',

JK3: 5'-GCCCATTTTCGCSTTCTCTGTAACAGA-3'.

Результаты ПЦР-ПДРФ-анализа представлены на рисунке.



Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами JK5+JK3 и эндонуклеазным расщеплением ферментом *HinfI* (препараты ДНК из крови и спермы, выделенные предложенными методами)

**Обозначения:** 1-2) генотип AA (134/131/85 bp (*HinfI*)) – кровь; 3-4) генотип AB (265/134/131/84 bp (*HinfI*)) – кровь; 5-6) генотип BB (265/85 bp (*HinfI*)) – кровь; 7-8) генотип AA (134/131/85 bp (*HinfI*)) – сперма; 9-10) генотип AB (265/134/131/84 bp (*HinfI*)) – сперма; 11-12) генотип BB (265/85 bp (*HinfI*)) – сперма; 13) цельный ПЦР-фрагмент гена каппа-казеина (350 bp) – кровь; 14) цельный ПЦР-фрагмент гена каппа-казеина (350 bp) – сперма; М) ДНК-маркеры 1000-100 bp (СибЭнзим).

Праймеры JK5+JK3 инициируют амплификацию фрагмента гена каппа-казеина крупного рогатого скота длиной 350 bp, а ПДРФ-*HinfI* профиль (AA=134/131/85 bp, BB=265/85 bp и AB=265/134/131/84 bp) позволяет установить его генотипы.

**Вывод.** Предлагаемые нами способы выделения ДНК из крови и спермы показали результативность и качество пробоподготовки, что подтверждено проведенными молекулярно-генетическими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА: 1. Анализ генома / Под ред. К.М. Дейвиса, пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 246 с. 2. Вафин, Р.Р. Совершенствование способов генодиагностики и молекулярно-генетический анализ хламидий : дисс. ... докт. биол. наук : 03.00.07/16.00.03 / Вафин Рамиль Ришадович. – Казань, 2009. – 230 с. 3. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук, пер. с англ. // М.: Мир, 1984. – 399 с. 4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги, пер. с англ. – М.: Мир, 1999. – 558 с. 5. Ребриков, Д.В. Полиморфные молекулярно-генетические маркеры и определение их аллельного статуса в сложных смесях молекул нуклеиновых кислот : автореф. дисс. ... докт. биол. наук : 03.00.15 / 03.00.03 / Ребриков Денис Владимирович. – М., 2008. – 45 с. 6. Beld, M. Fractionation of nucleic acids into single-stranded and double-stranded forms / M. Beld, C. Sol, J. Goudsmit, R. Boom // Nucl. Acids Res. – 1996. – V. 24. – № 13. – P. 2618-2619. 7. Boom, R. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen et al. // J. Clin. Microbiol. – 1990. – V. 28. – № 3. – P. 495-503. 8. Medrano, J.F. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification / J.F. Medrano, E. Aguilar-Cordova // Bio. Technology. – 1990. – V. 8. – P. 144-145.

#### ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КРОВИ И СПЕРМЫ

Ахметов Т.М., Тюлькин С.В., Нургалиев Ф.М.

#### Резюме

В данной работе представлены новые способы выделения ДНК из крови и спермы. Аммиачный и комбинированный щелочной способы

выделения нуклеиновых кислот из различного биологического материала позволяют получать препараты ДНК пригодные для ПЦР-анализа.

#### OPTIMIZATION TECHNIQS OF EXTRACTION DNA FROM BLOOD AND SEMEN

Ahmetov T.M., Tjulkin S.V., Nurgaliev F.M.

#### Summary

In the given work new methods extraction of DNA from blood and sperm are presented. Ammoniac and combined alkaline methods extraction of nucleinic acids from a various biological material allow to receive DNA preparations suitable for the PCR-analysis.

УДК 619:616-084.618.14-002

### ПРОФИЛАКТИКА ПОСЛЕРОДОВОЙ СУБИНВОЛЮЦИИ МАТКИ У КОРОВ

**Багрова М.А., Сунагатуллин Ф.А.**

ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной  
медицины имени Н.Э. Баумана»

**Ключевые слова:** послеродовая субинволюция матки у коров, профилактика.

**Key words:** puerperalis subinvolutio uteri at cows, preventive

Субинволюция матки – заболевание, характеризующееся замедлением процессов развития матки после родов до состояния, присущего этому органу у не беременных животных. Ее особая опасность для последующей воспроизводительной функции у коров заключается в том, что на ее фоне очень часто развиваются гнойные и гнойно-катаральные эндометриты и функциональные расстройства яичников.

Различают две формы проявления послеродовой субинволюции матки: острая – развивается в первые дни после родов и протекает в тяжелой форме, подострая – протекает в легкой форме и выявляется, как правило, через 2-3 недели после родов.

При острой (тяжелой) форме течения патологического процесса к 6-7 дню лохии приобретают буро-коричневый или грязно-бурый цвет, водянистую консистенцию, примесь серо-бурых хлопьев крошковатой массы, неприятный гнилостный запах. У коровы отмечаются потуги, корень хвоста приподнят, животное принимает позу мочеиспускания, отмечаются общее угнетение, снижение аппетита и молочной