

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 (25-37⁰С) и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95⁰С 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 60⁰С в течение 10 мин. К лизату добавляли равный объем (50 мкл) 1М Трис-HCl (pH 8,0) и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре. К полученному гомогенату добавляли 500 мкл 96% этанола и выдерживали полученную смесь при -20⁰С в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при 60⁰С 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 60⁰С в течение 10 мин, затем повторно встряхивали на вортексе и выдерживали в термостате при 60⁰С в течение 10 мин. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95⁰С 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-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA-Na (pH 8,0), 2% SDS, 1 mg/ml протеиназы К, 10 mM 2-меркаптоэтанол), тщательно суспендировали на вортексе и инкубировали при 55⁰С 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 55⁰С 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 вортексе при комнатной температуре. Затем смешивали с 500 мкл 96% этанола осторожным покачиванием пробирки и выдерживали полученную смесь в морозильнике при -20°C в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при 60°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°C в течение 15 мин, затем повторно встряхивали на вортексе и повторяли процедуру термостатирования (60°C , 15 мин). Полученный гомогенат инкубировали в термостате при 95°C в течение 15 мин с открытой пробиркой. Препараты ДНК хранили в условиях морозильника. Перед использованием пробы ДНК размораживали в термостате при 37°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°C – 4 мин; $\times 40$: 94°C – 10 сек, 63°C – 10 сек, 72°C – 10 сек; $\times 1$: 72°C – 5 мин; хранение: 4°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°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 – сульфидредуцента, разрушающего дисульфидные связи, что в конечном счете позволяло протеиназе К и SDS довершить процедуру лизиса.

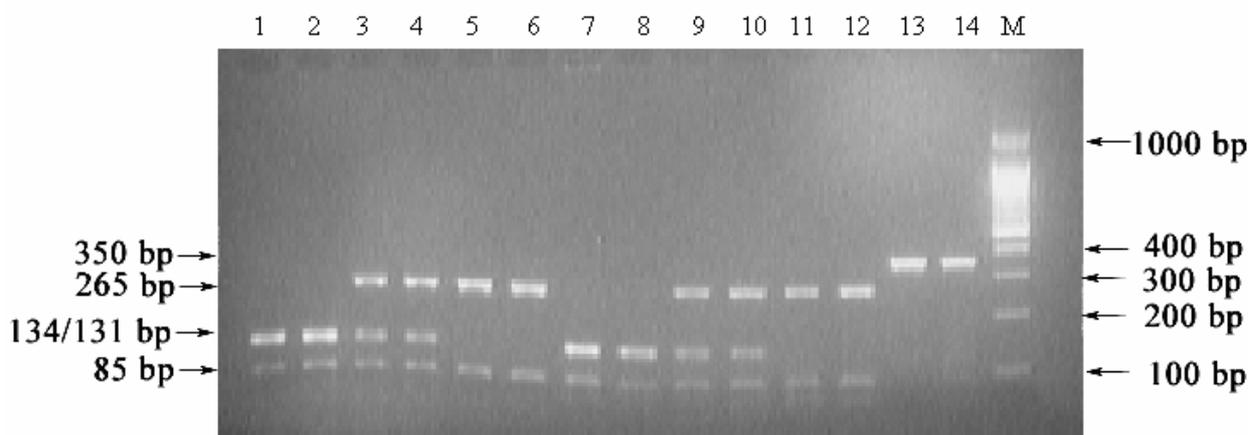
Заключительным этапом комбинированного щелочного способа экстракции ядерной ДНК из лейкоцитов и спермы крупного рогатого скота являлось применение 10% раствора аммиака, использованного в качестве растворителя осажденного нуклеопротеидного комплекса, предварительно экстрагированного NaOH. Выбранный подход 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 А и В 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