

5. Протерин В. П. Проблемы в селекции быков-производителей генофондных пород России / В. П. Протерин, В. Л. Ялуга, И. В. Селькова, И. В. Кувакина, Е. Д. Хуснутдинова // Зоотехния. – 2022. – №4. – С. 2–5.

6. Сафронов С. Л. Сравнительная характеристика молочной продуктивности коров разного продуктивного использования / С. Л. Сафронов, Н. М. Костомахин, О. И. Соловьева, В. И. Остроухова // Зоотехния. – 2022. – №4. – С. 26–28.

7. Сударев Н. П. Продуктивное долголетие

и эффективность использования коров при разных способах содержания в промышленных условиях / Н. П. Сударев, Д. А. Былкасимов, Д. В. Абрампальская, С. В. Чарчейшвили, К. В. Востриков // Зоотехния. – 2022. – №3. – С. 2–5.

8. Gukezhev V. M. Forecasts and reality of the use of the gene pool of Holstein cattle / V. M. Gukezhev, M. S. Gabaev, Zh. Kh. Zhashuev // – С. 264–274. DOI: 10.34660/INF.2022.81.91.033.

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-3

УДК 636.2+636.082.2

### **ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ РАЗНЫХ ВИДОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

**Ковалюк Наталья Викторовна**, д-р биол. наук

**Волченко Анастасия Евгеньевна**, канд. биол. наук

**Куликова Анна Яковлевна**, д-р с.-х. наук

*ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,*

*г. Краснодар, Российская Федерация*

Первым этапом, влияющим на результат молекулярно-генетического исследования и дальнейшую идентификацию биоматериала, является процедура выделения и очистки ДНК. В статье даны практические рекомендации по выделению ДНК из разных видов биологического материала: крови, спермы, шерсти и выщипов ткани. Описаны исследования по оптимизации методики выделения ДНК из спермы.

**Ключевые слова:** выделение ДНК; кровь; шерсть; сперма; выщип ткани

### **FEATURES OF DNA ISOLATION FROM DIFFERENT TYPES OF BIOLOGICAL MATERIAL**

**Kovalyuk Natalia Viktorovna**, Dr. Biol. Sci.

**Volchenko Anastasia Evgenievna**, PhD Biol. Sci.

**Kulikova Anna Yakovlevna**, Dr. Ag. Sci.

*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation*

The first step that affects the result of molecular genetic research and further identification of the biomaterial is the procedure for isolating and purifying DNA. The paper gives practical recommendations for DNA extraction from different types of biological material: blood, semen, wool and tissue plucks. Studies on optimizing the technique for extracting DNA from sperm are described.

**Key words:** DNA extraction, blood, wool, semen, tissue plucking

При генотипировании сельскохозяйственных животных: коров, свиней, овец, приходится иметь дело с различными видами биологического материала: кровью, шерстью, спермой и выщипами. Критерием успешности

выделения, помимо стандартных инструментальных определений (спектрометрии), является прохождение ферментативных реакций с выделенной ДНК (например, ПЦР).

**Методика исследований.** При выделе-

нии ДНК из крови обычно не возникает проблем. Количество ядерных клеток (лимфоцитов) даже в небольшом объеме крови достаточно велико (около 50 мкл крови достаточно для постановки нескольких десятков ПЦР реакций). Однако гемоглобин является сильным ингибитором полимеразной цепной реакции, поэтому процедура выделения из крови, как правило, учитывает этот момент (например, добавляются дополнительные стадии промывки или специальные ингредиенты). Мы выделяем ДНК из крови набором реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва).

Шерсть содержит существенно меньшее количество ДНК. Особенно мало ДНК в фолликулах выпавших шерстинок (в 10–20 раз меньше, чем в живых) и в стержнях шерстинок. В связи с этим при взятии материала следует стараться выщипнуть шерстинки вместе с волосными фолликулами. Это в значительной степени облегчает процесс последующего выделения ДНК и генотипирования. Приходящие на исследование образцы шерсти мы обрабатываем следующим образом: удерживая шерсть пинцетом, ножницами удаляем ту часть, которая не содержит фолликулы. Содержащие фолликулы участки используются для выделения ДНК. Для прохождения нескольких ПЦР-реакции достаточно взять на выделение около 10 таких фрагментов.

При выделении ДНК из ткани выщипа основной критической стадией является стадия измельчения ткани. Чем лучше она измельчена, тем больше выход ДНК. Наилучшим образом можно измельчить образцы тканей (вес пробы составляет около 0,1 г), предварительно замороженные в жидком азоте, растерев их в ступке. Конечно, при наличии в лаборатории гомогенизатора, задача измельчения проб значительно упрощается.

Особенность выделения ДНК из спермы заключается в том, что хроматин сперматозоидов имеет принципиальное отличие от хроматина соматических клеток – его структура дополнительно стабилизирована дисульфидными связями. Поэтому применяемый по стандартной процедуре выделения ДНК протеолиз в случае спермального хроматина малоэффективен и идет очень медленно, а используемые для диссоциации нуклеопротеинов детергенты практически не оказывают на него солибилизирующего действия. В ре-

зультате выход спермальной ДНК оказывается практически нулевым. Для преодоления этой трудности при выделении ДНК из спермы в клеточный лизат вводят дополнительно реагенты-тиовосстановители, например, дитиотрейтол или 2-меркаптоэтанол, которые разрушают дисульфидные белковые шивки [1]. Это позволяет продолжить процесс по стандартной схеме.

### **Результаты исследований и их обсуждение.**

Нами проведены исследования по оптимизации методики выделения ДНК из спермы.

Образцы спермы быков-производителей были представлены в трех формах хранения:

а) криоконсервированная сперма в гранулах объемом 200 мкл;

б) криоконсервированная сперма в полипропиленовых соломинках (паетах) объемом 200 мкл;

в) образцы спермы, нанесенные на разные типы фильтровальной бумаги.

Была поставлена задача – отработать оптимальный вариант выделения ДНК из каждой представленной формы хранения семени быков-производителей. Для выделения ДНК из образцов семени использовали:

– набор реагентов Diatom™ Prep 100 ООО «Лаборатория Изоген»;

– 0,2 % 2-меркаптоэтанол;

– 10 мМ дитиотрейтол.

На первом этапе брали 12 образцов семени, хранящегося в гранулах по 200 мкл. Помещали каждую гранулу в пробирку «Эппендорф» объемом 1,5 мл и размораживали при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее перемешивали пипетированием до гомогенного состояния и от каждого образца отбирали по 100 мкл материала в другие пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл, остаток семени повторно замораживали при  $t^{\circ} = -20^{\circ} \text{C}$  для хранения. Затем приступали к выделению ДНК по одной из стандартных методик [2].

В первые четыре пробирки добавляли по 400 мкл лизирующего раствора, ресуспендировали пробы на вортексе и инкубировали 40 мин при  $65^{\circ} \text{C}$ . В пробирки с лизатом + 20 мкл суспензии сорбента (сорбент встряхивали на вортексе). Далее приступали к выделению ДНК по стандартной методике. Выделить ДНК из семени по этой схеме не удалось.

В оставшиеся пробирки к клеточному лизату дополнительно добавляли реагенты-тиовосстановители. Во вторые 4 пробирки к

лизату добавили по 2 мкл 0,2 % 2-меркаптоэтанола. В оставшиеся 4 пробирки внесли по 1 мкл 10 мМ дитиотрейтола. Далее продолжили выделение ДНК по схеме первых четырех пробирок. В результате ДНК из этих восьми образцов успешно выделилась.

На втором этапе брали 12 образцов семени хранящихся в полипропиленовых соломинках по 100 мкл.

От каждой полипропиленовой соломинки аккуратно ножницами отрезали кончики и помещали соломинки в пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Семя в паетах размораживали при комнатной температуре.

Установили, что выделение ДНК из семени (гранула, паета) без использования реагентов-тиовосстановителей (2-меркаптоэтанола или дитиотрейтола) является неэффективным. При этом принципиальной разницы в действии на процесс выделения между 2-меркаптоэтанолом и дитиотрейтолом не наблюдается.

На третьем этапе выделение проводили из 12 образцов нанесенных на фильтры:

- 4 образца нанесенных на фильтр плотностью №1 (рыхлая плотность, d пор 20-25 мкм, вес 68 г/м<sup>2</sup>);
- 4 образца нанесенных на фильтр плотностью №2 (плотная узкопористая, d пор 8-10 мкм, вес 120 г/м<sup>2</sup>);
- 4 образца нанесенных на фильтр плотностью №3 (высокая плотность, d пор < 2

мкм, вес 165 г/м<sup>2</sup>).

Каждый фильтр измельчали с помощью ножниц (фламбируя ножницы от пробы к пробе) и переносили в пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл. К образцам добавляли по 600 мкл лизирующего раствора + 1,5 мкл дитиотрейтола и инкубировали при 65° С 40 минут. Далее приступали к выделению по стандартной методике.

В результате выход спермальной ДНК оказался прямо пропорциональным увеличению плотности фильтра (концентрация ДНК определялась визуально в агарозном геле после электрофореза).

**Выводы.** Выделение ДНК из каждого вида биологического материала имеет свои особенности. Знание этих особенностей, позволяет проводить успешное выделение ДНК.

### Список литературы

1. Перепечина И. О. Исследование объектов судебно-биологической экспертизы полимеразной цепной реакцией / И. О. Перепечина, Т. В. Стегнова, М.Г. Пименов // Методические рекомендации: М., ЭКЦ МВД РФ, 1996. – 24 с.
3. Лубенникова М. В. Выделение ДНК – важный этап молекулярно-генетического исследования / М. В. Лубенникова, В. А. Афанасьев, К. А. Афанасьев // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. – 2020. – № 2 (21). С. 18.

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-4  
УДК 636.32/38.082.12

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА СОМАТОТРОПИНА (GH) У ОВЕЦ ЮЖНОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ

**Куликова Анна Яковлевна**, д-р с.-х. наук  
ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,  
г. Краснодар, Российская Федерация

В результате генотипирования в субпопуляции овец южной мясной породы с использованием ПЦР-ПДРФ анализа установлена разная частота встречаемости аллелей и генотипов гена в локусе гармона роста (GH), и их ассоциативные связи с ростом и развитием, формированием мясной продуктивности и плодовитостью. Гетерозиготные особи GH\_AB по живой массе превосходили гомозиготных GH\_AA на 2,4–3,95 %, по настригу шерсти – на 2,4 %. по плодовитости – на 12 %.

**Ключевые слова:** полиморфизм; ген; аллель; генотип; продуктивные качества