

УДК 637.52/055:636.086(577.213.3)

Назар Б. І., к. вет. н. ©

E-mail: bobnaz@ukr.net

*Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів, Україна***ОЦІНКА МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ**

У статті наведено основні методичні підходи та критерії щодо екстракції й очищення ДНК із біологічного матеріалу для аналізу методом полімеразно-ланцюгової реакції. Описано метод виділення ДНК із використанням протеїнази К котрий дозволяє отримати ДНК без домішки білків, однак є доволі трудомістким та складається з декількох етапів. А також метод виділення ДНК з використанням лізуючих буферів, у яких є сильні хаотропні агенти, а саме гуанідинтіоціанат, який використовується за дослідження незначних кількостей ДНК. Останній метод є зручним, технологічним, проте слідові кількості гуанідинтіоціанату можуть інгібувати реакцію ампліфікації. Висока чутливість ПЛР-аналізу висуває жорсткі вимоги до методів екстракції й очищення ДНК із біоматеріалу, через це виникає необхідність індивідуально добирати відповідну методику, залежно від досліджуваного об'єкту і його початкового стану.

УДК 637.52/055:636.086(577.213.3)

Назар Б. І., к. вет. н.*Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, г. Львов, Украина***ОЦЕНКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

В статье приведены основные методические подходы и критерии экстракции и очистки ДНК из биологического материала для анализа методом полимеразной цепной реакции. Описано метод выделения ДНК с использованием протеиназы К, позволяющий получить ДНК без примеси белков, однако он довольно трудоемкий и состоит из нескольких этапов. А также метод выделения ДНК с использованием лизующих буферов в которых есть сильные хаотропные агенты, а именно гуанидинтиоцианат, используемый при исследовании незначительных количеств ДНК. Последний метод является удобным, технологичным, однако следовые количества гуанидинтиоцианата могут ингибировать реакцию амплификации. Высокая чувствительность ПЛР-анализа выдвигает жесткие требования к методам экстракции и очистки ДНК из биоматериала, поэтому возникает необходимость индивидуально подбирать соответствующую методику, в зависимости от исследуемого объекта и его исходного состояния.

UDC 637.52/055:636.086(577.213.3)

Nazar B. I.*State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives***ESTIMATION OF METHODS OF DNA SELECTION FROM BIOLOGICAL MATERIAL**

In the article basic methodical approaches and criteria are shown in relation to extraction and cleaning of DNA from biological material for an analysis by a method of

polymerase-chained reaction. The method of DNA selection is described with the use of K-proteinase, that allows to receive DNA without the admixture of proteins, however is sufficiently labor intensive process and consists of a few stages. Also a method of DNA selection with the use of lysis buffers that consists of strong chaotropic agents, namely, that is used for research of negligible quantities of DNA. The last method is comfortable and technological however the track amounts of guanidintiocyanate can inhibit reaction of amplification. The high sensitiveness of PCR-analysis pulls out hard requirements to the methods of extraction and cleaning of DNA from biomaterial, because of what there is a necessity to individually gather additionally corresponding methodology, depending on the investigated object and its initial state.

Проводячи видову ідентифікацію м'яса, м'ясної продукції, їх похідних у сухих та консервованих кормах для м'ясоїдних тварин, а також наявність-відсутність генетично модифікованих організмів у рослинній продукції, висока якість розчину виділеної ДНК впливає на якість продуктів ампліфікації, забезпечує здобуття вірогідніших і збалансованих результатів, незалежно від методу аналізу, що використовується.

Метою наших досліджень було дати порівняльну оцінку різних методів виділення ДНК із отриманням високої якості та максимально можливого виходу ДНК, враховуючи кількість, вид та стан матеріалу, що досліджувався (термічну обробку чи довготривале заморожування продукції) та усунути вплив інгібіторів.

В основу методів виділення покладено загальний принцип екстракції, який полягає в руйнуванні плазматичної і ядерної мембран клітин, звільненні від білків, видаленні або нейтралізації клітинних компонентів і домішок, з метою отримання ДНК, придатної для ампліфікації у полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР). Методики умовно можна розділити на кілька груп, кожна з яких об'єднує методи, що передбачають застосування різних варіантів депротейнізації (отримання ДНК, очищеної від білків).

До першої групи належать методи, засновані на використанні лізуючих буферів, до складу яких входять аніонні або неіонні детергенти (додецилсульфат натрію, тритон X-100), а також протеолітичний ензим протеїназа К, що спричинюють швидку денатурацію білків й інактивацію нуклеаз. Остаточна депротейнізація проводиться сумішшю хлороформу й ізоамілового спирту; осадження ДНК із розчину здійснюється ізопропанолом або етанолом.

До другої групи належать методи, основою лізуючих буферів яких є сильні хаотропні агенти (гуанідинтіоціанат, сечовина), що руйнують клітинні мембрани і денатурують клітинні білки. Із розчину ДНК осідає на нуклеосорбент, з подальшим її елююванням.

До третьої групи належать методи, засновані на використанні аніонообмінної смоли Челекс-100. Процедура виділення ДНК містить тривалу інкубацію і кип'ятіння об'єкта, що досліджується в розчині Челекс-100, та забезпечує очищення від металовмісних сполук і протеїнів. Метод не пов'язаний із великими витратами часу, використанням агресивних речовин. Виділення ДНК здійснюється в одній пробірці, що знижує ризик забруднення зразків.

До четвертої групи належать методи, засновані на властивостях деяких солей у високих концентраціях утворювати комплекси із білками і полісахаридами. Наприклад, за використання у лізуючому буфері аніонного детергенту додецилсульфату натрію і протеолітичного ензиму протеїнази К відбувається денатурація білків, внаслідок чого руйнуються мембрани клітин і ДНК виходить у розчин. Білки і частина полісахаридів після додавання до лізату ацетату калію за температури 0 °С утворюють комплекси із додецилацетатом калію і видаляються

центрифугуванням; ДНК із розчину осаджується ізопропанолом. Метод дозволяє провести депротейнізацію без органічних розчинників.

Встановлення кількості виділеної ДНК проводиться для оптимізації концентрації ДНК, яка вноситься у ПЛР. Ампліфікація мікросателітних локусів, як правило, здійснюється при значеннях концентрації ДНК у діапазонах від 0,5 до 2,0 нг, внесення незбалансованої кількості ДНК у реакцію призводить до зниження її чутливості і неотримання неспецифічних продуктів, або до їх повної відсутності. Для встановлення кількості виділеної ДНК у розчині широко використовуються три методи. Найбільш простим і точним є спектрофотометричний метод, однак він має дуже малу чутливість. Концентрацію ДНК експертних об'єктів із низьким умістом ДНК частіше встановлюють за інтенсивністю флюоресценції її комплексів з бромистим етидієм або Hoechst 33258 з допомогою флюорометрів. Концентрацію виділеної ДНК у розчині визначають за допомогою ДНК-флюориметра. У наявності ДНК у біс-бензimidу (барвник Hoechst 33258 або бромистий етидій) змінюються параметри флюоресценції, інтенсивність якої пропорційна концентрації ДНК. Інтеркалюючий барвник Hoechst 33258 або бромистий етидій специфічно взаємодіє, зв'язуючись тільки з дволанцюговою ДНК, що дозволяє коректно вимірювати концентрацію ДНК у присутності білкових і РНК-контанінантів.

Матеріали і методи. Для порівняльної оцінки методів виділення нами було використано два методичних підходи — це виділення ДНК із використанням протеїнази К та виділення ДНК з використанням лізуючих буферів, у складі яких є сильні хаотропні агенти (гуанідинтіюціонат).

В основі першого методу лежить лізис клітин додецилсульфатом натрію (SDS) і деградація білків протеїназою К. Клітинний лізат очищують органічними розчинниками, ДНК висаджували холодним спиртом із подальшим розчиненням в ТЕ(Трис-ЕДТА) буфері. У 1,5-мл мікро-центрифужній пробірці розміщують подрібнений біоматеріал, 100-200 мкл рідкої крові, додають 300–600 мкл лізуючого буферу TENS, до складу якого входить 10 мМ Трис-НСІ, 5мМ Na₂ЕДТА, 0,1М NaCl, 2 % SDS. Додають 2-8мкл (до кісток і внутрішніх органів 10-25 мкл) водного розчину протеїнази К (20 мг/мл), уміст пробірки перемішують. Зразок інкубують за температури 56 °С протягом від 1–2 год. до 24–48 год. (для кісток, внутрішніх органів). Після довготривалої інкубації в пробірку додають дробино по 10–25 мкл розчину протеїнази К (20 мг/мл). Предмет-носії видаляють, перемістивши в чисту пробірку та максимально відібравши з нього залишки розчину. Після дослідження твердого біоматеріалу в чисту пробірку переносять надосадову рідину. Додають 1/5 (2/5 для кісток, внутрішніх органів) частину від загального об'єму 3М ацетату амонію або ацетату калію та поміщують на кілька хвилин в холод. Центрифугують 5хв. при 10 тис. об/хв. Супернатант відбирають у чисту пробірку. Екстракцію та очистку ДНК проводять двома шляхами: 1) До надосадової рідини додають рівний об'єм хлороформу (або суміші хлороформ-ізоамілового спирту 24:1). Акуратно перемішують протягом 3-5 хвилин. Центрифугують 20 хв. за тах об/хв. Верхню водну фазу акуратно відбирають у нову пробірку, додають 2,5 об'єму 96° етилового спирту. 2) До надосадової рідини додають рівний об'єм ізопропілового спирту. Після процедури 1 або 2 пробірку поміщують у морозильну камеру на 1-18 год., центрифугують 15-30 хв. за тах об/хв. Супернатант видаляють декантуванням. Осад просушують, промивають 200-500 мкл 75° етилового спирту (перевертаючи в руках), центрифугують 5 хв. при тах об/хв. Супернатант видаляють декантуванням, осад просушують на фільтрувальному папері (можна підсушити в

термостаті при 56 °С) та додають до нього 60-120 мкл ТЕ-буферу, перемішують. Для кращого розчинення можна розмістити пробірки в термостат за температури 56 °С на 5–10 хв. Зразок зберігають за 4 °С. Для тривалого зберігання зразок заморожують.

Друга методика використовується за наявності незначних кількостей ДНК, забрудненні, впливі предмету-носія. Процедура виділення ДНК складається із етапів руйнування клітин за допомогою лізуючого буферу, що містить гуанідинтіоціанат, подальшої екстракції ДНК на сорбент SiO₂ та її елюації в ТЕ-буфер після нагрівання. У 1,5-мл мікро-центрифужній пробірці розміщують подрібнений матеріал, додають 300–600 мкл лізуючого буферу, до складу якого входить 10М гуанідинтіоціанат, 0,1М трис-НСІ, 0,2М Na₂ЕДТА, 2,6 % тритон X-100, перемішують на вортексі 3–5 сек. Розміщують у термостаті на 10 хв. за температури 65 °С. Предмет-носії видаляють, перемістивши в чисту пробірку та максимально відібравши з нього залишки розчину. Після дослідження твердого біоматеріалу в чисту пробірку переносять надосадову рідину. Сорбент ретельно перемішують на вортексі та додають 30–40 мкл у пробірку з лізатом. Протягом 10 хв. пробірку перемішують. Центрифугують 15 сек. при 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють повністю та додають 300 мкл відмиваючого розчину, що містить 10М гуанідинтіоціанат, 0,1М трис-НСІ, ретельно перемішують на вортексі, центрифугують 15 сек. при 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють повністю та додають 700 мкл етанолу, ретельно перемішують на вортексі, центрифугують 15 сек. за 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють, додають 700 мкл ацетону, ретельно перемішують на вортексі, центрифугують 15 сек. за 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють повністю. Відкриті пробірки розміщують у термостаті за температури 65 °С до повного висихання (осад повинен тріснути). До осаду додають 70-100 мкл ТЕ-буферу, перемішують на вортексі, розміщують у термостаті за температури 65 °С 5–10 хв. Центрифугують 1 хв. за 7 тис. об/хв. Після повторного використання елюату повторюють струшування і центрифугування. Для тривалого зберігання надосадову рідину відбирають у чисту пробірку і зберігають у морозильній камері (мінус 20 °С).

Вимірювання концентрації виділеної ДНК двома методами встановлювали за допомогою флуориметра за інтенсивністю флуоресценції її комплексів з бромистим етидієм.

Після вимірювання концентрації ДНК були використані такі розчини :

1. Розчин ТЕ (1 мМ Na₃ЕДТА; 10 мМ трис-НСІ; рН середовища – 8,0).
2. Розчин ДНК із відомою концентрацією (контрольна високомолекулярна ДНК із концентрацією 10 нг/мл).
3. х TNE буфер (100 мМ трис-НСІ; рН 7,4; 10 мМ Na₃ЕДТА; рН 8,0; 1 М NaCl).
4. Водний розчин 10 мг/мл інтеркалюювального барвника Hoechst 33258.

Флуориметр вмикали за 15 хв. до вимірювання. Калібрували відносно зразка контрольної ДНК із відомою концентрацією в 1хTNE буфері за наявності 10 мг/мл бромистого етидію. Вимірювали концентрацію одержаних препаратів ДНК в 1хTNE за наявності 10 мг/мл бромистого етидію.

Отримані результати.

Методи виділення ДНК із використанням протеїнази К дозволяють одержати ДНК без домішки білків. Однак, вони доволі праце-місткі, складаються із декількох етапів.

Методи виділення ДНК із використанням лізуючих буферів у яких є сильні хаотропні агенти (гванідинтіоціонат) використовуються за незначних кількостей ДНК, зручні, технологічні, проте слідові кількості гванідинтіоціанату можуть інгібувати реакцію ампліфікації. Внаслідок багатоетапності процесу підвищується ймовірність значних втрат ДНК, а також можливість контамінації між пробами.

Висновки. Висока чутливість ПЛР-аналізу висуває жорсткі вимоги до методів екстракції й очищення ДНК із біоматеріалу, через це виникає необхідність індивідуально добирати відповідну методику, залежно від досліджуваного об'єкту і його початкового стану.

Література

1. Каверин В. А. Совершенствование методов идентификации примесей ГМО в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения : автореф. дис. на здобуття наук. ст. канд. биол. наук / А. В. Каверин. – М., 2006. – 25 с.

2. Симоненко С. В. Контроль за содержанием генно-модифицированных источников (ГМИ) в продуктах детского питания / С. В. Симоненко, С. В. Фелик, Т. А. Антипова // Современные технологии производства и переработки сельскохозяйственного сырья для создания конкурентоспособности пищевых продуктов / Волгогр. науч.-исслед. технол. ин-т мясо-молоч. скотоводства и переработки продукции животноводства. – Волгоград, 2007. – Ч. 1. – С. 52–54.

3. Van Hal N. L., Vorst O., Van Houwelingen A. M., Kok E. J., Peijnenburg A., Aharoni A., Van Tunen A. J., Keijer J. The application of DNA microarrays in gene expression analysis // Journal of Biotechnology. – 2000. – 78. – P. 271–280.

Стаття надійшла до редакції 11.03.2015

УДК 636.4:591.11

Огородник Н. З., к.вет.н., ст. наук. співр.

E-mail: nataohorodnyk@ukr.net

Віщур О. І., д.вет.н., професор, **Кичун І. В.**, к.б.н., ст. наук. співр. ©

Інститут біології тварин НААН, м. Львів, Україна

КЛІТИННІ Й ГУМОРАЛЬНІ ФАКТОРИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ПОРОСЯТ ЗА ВПЛИВУ ПРЕПАРАТУ «ВІТАРМІН»

Відлучення поросят від свиноматок супроводжується посиленням процесів пероксидного окиснення ліпідів, зниженням неспецифічної резистентності й підвищенням їх сприйнятливості до захворювань. Відомо, що вітаміни та мінеральні елементи здатні підвищувати стійкість тварин, а введення їх у ліпосомальній формі дозволило б істотно збільшити їхню ефективність.

У зв'язку із цим, було досліджено динаміку змін показників неспецифічної резистентності у поросят при відлученні, а також за дії комплексного ліпосомального препарату «Вітармін». Встановлено, що наявні у складі препарату компоненти — жиророзчинні вітаміни А, D₃, Е, L-аргінін, Цинк, Селен, Кобальт і Магній, позитивно впливають на клітинні та гуморальні фактори захисту в організмі поросят після відлучення від свиноматок. Так, на 10-ту добу після відлучення у поросят дослідної групи виявлено зниження фагоцитарної активності нейтрофілів крові та зростання комплементарної активності сироватки крові, а також тенденцію до зниження впродовж досліджень вмісту загальних імуноглобулінів і бактерицидної активності сироватки крові. Показано, що парентеральне введення поросят перед відлученням від свиноматок препарату «Вітармін» сприяє вірогідному підвищенню фагоцитарної активності нейтрофілів крові на 5-ту добу після відлучення, а вмісту загальних імуноглобулінів та лізоцимної активності сироватки крові — на 1-шу добу після відлучення. При цьому

© Огородник Н. З., Віщур О. І., Кичун І. В., 2015