

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА GDF-9 У КОРОВ

Фактор дифференциации роста 9 (GDF9) принадлежит трансформирующему фактору роста  $\beta$  суперсемейства и играет важнейшую роль в регуляции роста фолликулов и скорости овуляции. В статье рассматривается возможность применения полимеразной цепной реакции для изучения полиморфизма гена GDF 9 у коров черно-пестрой породы. Проведена оптимизация условий ПЦР, т.е. установлена оптимальная температура отжига праймеров и концентрация магния хлорида в реакционной смеси.

*Ключевые слова:* ПЦР, ПДРФ, полиморфизм, фактор дифференциации роста 9, фолликулогенез.

УДК 619:616.981.459.636.22/28

**К.Б. Бияшев<sup>2</sup>, Г.Д. Чужебаева<sup>1</sup>, Ж.С. Киркимбаева<sup>2</sup>, С.Е. Ермагамбетова<sup>2</sup>,  
Р.М. Рыщанова<sup>1</sup>, А. Ульянов<sup>1</sup>**

*Костанайский государственный университет имени А. Байтурсынова<sup>1</sup>  
Казахский национальный аграрный университет<sup>2</sup>*

## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК PASTEURELLA MULTOCIDA ИЗ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПЦР: СРАВНЕНИЕ И ОЦЕНКА

### **Аннотация**

В статье на основании литературных источников и собственных исследований приведены результаты исследований по выбору оптимального метода выделения ДНК *Pasteurellamultocida* из биологического материала.

В результате выбора оптимальных методов выделения ДНК *Pasteurellamultocida* из биологического материала, определили, что все использованные в работе методы выделения ДНК вполне приемлемы для экстракции геномной ДНК *Pasteurellamultocida*, но наибольшее количество ДНК выделено с помощью ФХЭ с гуанидином. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК *Pasteurellamultocida* имело среднее значение  $1,7 > 0,04$ . Несмотря на многоступенчатость и продолжительность анализа в сравнении с новыми высокочувствительными и простыми в исполнении методами выделения ДНК, этот метод является оптимальным для выделения аналитических количеств ДНК в случаях, когда нет большого потока исследований.

*Ключевые слова:* *Pasteurellamultocida*, выделение, ДНК, спектрофотометрия, электрофорез.

### **Введение**

К настоящему времени в арсенале исследователей имеется довольно большой набор методов экстракции и очистки ДНК, причем эти методы продолжают совершенствоваться и модифицироваться применительно к новым объектам исследования. В связи с разнообразием живых объектов универсальных методов выделения ДНК не существует. Использование того или иного метода выделения ДНК диктуется, во-первых, спецификой

изучаемого материала, а во-вторых, тем, какая преследуется цель: получение суммарной, ядерной, хлоропластной ДНК или других ее препаратов[1]. Метод выделения ДНК должен быть относительно простым, хорошо воспроизводимым и давать возможность быстрого получения достаточных количеств удовлетворительно очищенных препаратов ДНК. Выход ДНК зависит от природы исходного материала и обусловлен содержанием ДНК в данной ткани, а также наличием и характером примесей, препятствующих очистке ДНК. В любом случае ДНК должна содержать минимальное количество примесей полисахаридов и белков (не более 2—3%), что отражается на так называемых спектральных характеристиках препаратов  $A_{260}/A_{280}$  приблизительно равное 1,8.[2].

Целью и задачей наших исследований, являлось подбор оптимальных вариантов выделения ДНК *Pasteurellamultocida* из биологического материала.

### **Материалы и методы**

Исследования проводились в лаборатории «Молекулярной биологии и генной инженерии вирусов» НИИПББ НЦБ РК, лаборатории противобактериозной биотехнологии Казахского национального аграрного университета, филиале Костанайская НИВС.

1. Метод фенол-хлороформной экстракции (ФХЭ) с предварительной обработкой протеиназой К. Клеточный осадок ресуспендировали в 300 мкл раствора № 1 (100 мМ трис-НСl рН 8,0, 10 мМ ЭДТА, 2 мг/мл лизоцима) и инкубировали 60 мин при 37°C. Добавляли 50 мкл раствора № 2 (8% додецилсульфат натрия (SDS) и 50 мкл протеиназы К (2 мг/мл). Хорошо перемешивали и инкубировали при 42°C 60 мин. Затем добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, не затрагивая нижнюю фазу и интерфазу. Проводили повторную экстракцию 400 мкл хлороформа. К водной фазе добавляли 40 мкл 3М ацетата натрия (рН 5,4) и 800 мкл 96% этилового спирта, тщательно перемешивали. Инкубировали в течение ночи при — 20°C. ДНК осаждали центрифугированием 15 мин при 12 000 об/мин. Осадок промывали 400 мкл 75% этилового спирта, сушили при 37°C в течение 15 мин и растворяли в 30 мкл воды[3].

2. Метод фенол-хлороформной экстракции с гуанидином. К клеточному осадку добавляли 250 мкл лизирующего буфера (6 М GuHCl, 40 мМ трис-НСl рН 6,4, 36 мМ ЭДТА) и тщательно перемешивали. Смесь прогревали 5 мин при 65°C и добавляли

125 мкл фенола и 125 мкл хлороформа. Далее выделяли так же, как и при ФХЭ с протеиназой К.

3. Метод сорбции ДНК на силикагеле. В пробирки емкостью 1,5 мл с клиническими образцами вносили по 250 мкл лизирующего раствора (6 М GuHCl, 40 мМ трис-НСl рН 6,4, 36 мМ ЭДТА) и тщательно перемешивали на вортексе. Прогревали пробирку 5 мин при 65°C, тщательно перемешивали на вортексе до полного растворения материала. Добавляли 20 мкл ресуспендированного на вортексе сорбента (Silica S-5631, "Sigma"), хорошо перемешивали и отстаивали 7—9 мин. Сорбент осаждали на микроцентрифуге в течение 30 сек. Отбирали супернатант и добавляли по 400 мкл отмывочного раствора (4 М GuHCl, 40 мМ трис-НСl рН 6,4), перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, осаждали на микроцентрифуге в течение 30 сек. и отбирали супернатант. Повторяли процедуру отмывки еще раз. Осадок промывали 70% этиловым спиртом и высушивали в термостате при 56°C в течение 10 мин. Добавляли 100 мкл элюирующего буфера (80 мМ NaOH, 0,5 мМ ЭДТА), тщательно ресуспендировали и помещали в термостат при 56°C на 10 мин, затем добавляли 5,3 мкл раствора 1 М трис-НСl рН 6,4 и встряхивали на вортексе. Суспензию осаждали на микроцентрифуге при 10 000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант содержал очищенную ДНК[4,5].

Выделение ДНК другим методом проводили с применением лизирующего буфера, содержащего гуанидина гидрохлорид. Авторы опубликованных в литературе протоколов

используют разные хаотропные агенты, предпочтительно применяются гуанидинатиоционат (GuaSCN) или гуанидина гидрохлорид (GuaHCl), рекомендуемый диапазон рабочих концентраций которых от 1М до 4М для GuaSCN и 6-8М для GuaHCl[6].

### **Результаты исследований**

При выборе оптимальных методов выделения ДНК *Pasteurellamultocida*, учитывали некоторые особенности строения бактериальной клетки. Стенки грамотрицательных бактерий, к которым относится *Pasteurellamultocida*, более сложные по химическому составу, чем у грамположительных, в них содержится значительное количество липидов, связанных с белками и сахарами в сложные комплексы — липопротеиды и липополисахариды.

В нашем исследовании мы сравнили несколько способов выделения ДНК *Pasteurellamultocida*.

В первых двух методах для удаления белков применяли комбинацию растворителей фенол – хлороформ, которая является сильным средством депротеинизации. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. ДНК находится в верхней (водной) фазе, а денатурированные белки — в нижней (органической) фазе [6]. Водный экстракт переносится в чистую пробирку, и нуклеиновая кислота была осаждена 3М ацетатом натрия, с последующим промыванием осадка в спирте (100, 70% этанол). Методы с использованием фенол-хромосомной экстракции достаточно просты, недороги, обеспечивают стабильность препарата ДНК в процессе хранения, но их недостатком является тот факт, что фенол и хлороформ – токсичные соединения и требуют утилизации после использования[7].

В качестве лизирующих агентов использовали додецилсульфат натрия (SDS), ЭДТА и лизоцим. Анионные детергенты, к которым относится SDS в буферных растворах дезорганизуют двухслойные липидные образования мембран, разрушают нековалентные связи и стабилизируют белки, тем самым разрушаются липидно-белковые комплексы мембран, при этом ДНК экстрагируется в буфер [8]. Конечный размер получающихся фрагментов ДНК зависит от двух основных факторов: действия клеточных нуклеаз и механического разрушения ДНК в процессе выделения. Применение додецилсульфата натрия не только депротеинизирует бактериальную клетку, но также подавляет активность нуклеаз. ЭДТА и лизоцим разрыхляют наружную мембрану, ингибируют нуклеазы – разрушают клеточную стенку.

Клеточные белки удаляли обработкой протеолитическим ферментом – протеиназой К, который эффективно инактивирует нуклеазы, будучи устойчивым при этом к денатурирующим (SDS, мочевины), хелатирующим (ЭДТА) и сульфгидрильным агентам. Активация этого фермента более чем в 7 раз в присутствии мочевины и SDS обусловлена главным образом денатурацией белков-субстратов в этих условиях. Данная протеаза работает в широком диапазоне рН (4-12). Денатурирующие агенты повышают доступность пептидных связей белков для протеиназыК[9].

При выделении ДНК методом сорбции на силикагеле также использовали гуанидин гидрохлорид. Силиконовый матрикс связывает ДНК в присутствии высоких концентраций хаотропных солей, таких как гуанидингидрохлорид, которые разрушают гидрофобные взаимодействия. По определению исследователей, метод имеет два преимущества: дешевизна силикон диоксида и универсальность протокола для широкого приложения для очистки ДНК [10]. 1 мл/г силикон диоксида способен связать до 3-4,5 мкг ДНК и в таком состоянии стабильность ДНК сохраняется до 12 месяцев. Очевидно, что количество используемого силикагеля зависит от предполагаемого количества ДНК в исходном материале; ДНК отделяется от силикагеля при понижении концентрации соли, а

также быстрым центрифугированием (10 сек.); либо ДНК может быть отмыта небольшим объемом (от 5 мкл) воды, облегчить элюцию можно нагреванием. Предлагаемый метод прост, быстр и экономичен, не требует специальных колонок и оборудования, что делает его привлекательным при большом объеме образцов в экспериментах. Силикагель включается во многие коммерческие наборы экстракции ДНК.

Начальные условия были одинаковыми для всех методов, так как выделение проводилось из одного образца, разделенного на 6 равных частей. Для того чтобы свести к минимуму ошибку при наборе материала, исследование повторяли 3 раза и за количество ДНК принимали среднее значение.

После выделения ДНК *Pasteurellamultocida* вышеперечисленными методами проводили качественный и количественный анализ образца. Электрофорез проводили в 0,8 % агарозном геле в ТАЕ-буфере. Наибольшее количество ДНК выделяется с помощью ФХЭ с гуанидином и ФХЭ с предварительной обработкой протеиназой К. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК *Pasteurellamultocida* имело среднее значение 1,65. Результат качественного анализа полученного препарата ДНК представлен на электрофореграмме (рисунок 1).

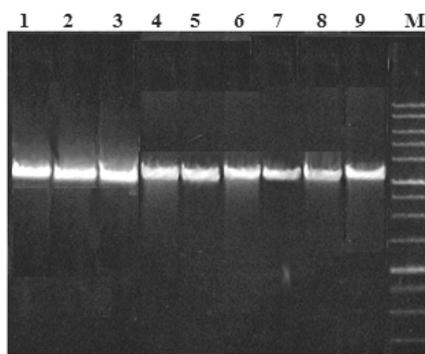


Рисунок 1 – Электрофореграмма выделенных ДНК *Pasteurellamultocida* различными методами: 1-3 - ФХЭ с гуанидином; 4-6 - ФХЭ с предварительной обработкой протеиназой К; 5-6 - сорбция ДНК на силикагеле

По чувствительности ФХЭ превосходит методы сорбции на силикагеле. Методы, основанные на ФХЭ, дают хороший выход ДНК, но очень трудоемки. Еще одним отрицательным фактором в них является токсичность фенола и хлороформа, что требует наличия вытяжного шкафа в лаборатории, где эти методы применяются.

В таблице 1 представлены результаты типичного эксперимента по выделению ДНК стабилизированной трилоном Б цельной крови молодняка крупного рогатого скота методом ФХЭ с гуанидином (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты выделения ДНК цельной крови крупного рогатого скота

Номер пробы	Концентрация ДНК (нг/мкл)	Выход ДНК из 100 мкл крови (мкг)	A 260/280
1	49,4	1,7	1,7
2	38,6	1,3	1,6
3	50,0	1,7	1,6
4	37,3	1,3	1,6
5	47,1	1,6	1,7
6	51,5	1,7	1,7

В данном эксперименте ДНК выделяли из 6-ти проб крови от разных животных. Выход ДНК варьировал в диапазоне 1,3 - 1,7 мкг из 100 мкл крови. Для определения чистоты выделенной ДНК её осаждали этанолом, растворяли в воде и определяли отношение оптических плотностей на 260 нм и 280 нм с использованием спектрофотометра Pro RNA/DNA Calculator «GenQuant». Отношение A260/A280 близкое к 1,8 указывает на то, что ДНК обладает высокой чистотой.

#### **Выводы**

В результате исследований по выбору оптимальных методов выделения ДНК *Pasteurellamultocida* выяснили, что все использованные в работе методы выделения ДНК вполне приемлемы для экстракции геномной ДНК *Pasteurellamultocida*, но наибольшее количество ДНК выделено с помощью ФХЭ с гуанидином. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК *Pasteurellamultocida* имело средние значения  $1,7 > 0,04$ . Несмотря на многоступенчатость и продолжительность анализа в сравнении с новыми высокочувствительными и простыми в исполнении методами выделения ДНК, этот метод является оптимальным для выделения аналитических количеств ДНК в случаях, когда нет большого потока исследований.

#### **Литература**

1. Ведерников В. Е. Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот. Журнал "Лаборатория" №4, 2012, с.14-15;
2. Рябушкина Н., Омашева М.Е., Галиакпаров Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. Биотехнология. Теория и практика. № 2, 2012. с. 13;
3. Jose Antonio Amigot, Montserrat Torremorell, Carlos Pijoan «Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurellamultocida* strains from pigs» Direct RAPD Evaluation of Bacteria without Conventional DNA Extraction// J. Clin. Microbiol. - 2008. - 29 p.
4. Евтыхова Е.Б., Мукантаев К.Н., Турсунов К., Сытник И.И., Карибаев Т.Б., Хасенов Б.Б., Шустов А.Б. Метод выделения ДНК и тест-система ПЦР в реальном времени для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Биотехнология. Теория и практика. № 2 2012, С 78 -84.
5. Antony P. X., G. K. Nair, V. Jayaprakasan, M. Miniand T. V. Aravindakshan 2007. Nucleic acid based differentiation of *Pasteurellamultocida* serotypes. The Internet Journal of Veterinary Medicine, 2 (2): 85-89.
6. Townsend, K. M., A. J. Frost, C. W. Lee, J. M. Papadimitriou and H. J. S. Dawkins, 1998. Development of PCR Assays for Species and Type-Specific Identification of *Pasteurellamultocida* Isolates. J. Clinical Microbiol., 36 (4): 1096–1100
7. Hopkins B.A., Huang T.H.M. & Olson L.D. (1998). Differentiating turkey post-vaccination isolates of *Pasteurellamultocida* using arbitrarily primed polymerase chain reaction. Avian Dis., 42, 265-274.
8. Kumar A. A, Shivachandra S. B, Biswas A, Singh V. P, Singh Vijendra P, Srivastava S. K (2004). Prevalent serotypes of *Pasteurellamultocida* isolated from different animal and avian species in India. Vet. res. Commun 28:657-667
9. Townsend K.M., Dawkins H.J., Papadimitriou J.M. (1997). REP-PCR analysis of *Pasteurellamultocida* isolates that cause hemorrhagic septicemia. Res Vet Sci 63:151-5.
10. Townsend, John D. Boyce, Jing Y. Chung, Alan J. Frost, and Ben Adler (2001). Genetic organization of *Pasteurellamultocida* cap loci and development of multiplex capsular PCR typing system. J. Clinical Microbiol., 39: 924-929.

Бияшев К.Б., Чужебаева Г.Д., Киркимбаева Ж.С., Ермагамбетова С.Е.,  
Рыщанова Р.М., Ульянов В.А.

PASTEURELLAMULTOCIDA ДНҚ ҮЛГІЛЕРІНІҢ ПТР - ӘДІСІМЕН БИОЛОГИЯЛЫҚ  
МАТЕРИЯДА ҚОЛДАНУ МАҚСАТЫНДА БӨЛУ ӘДІСТЕРІН:  
САЛЫСТЫРУ ЖӘНЕ БАҒАЛАУ

Мақалада, әдебиеттердегі мәліметтерге және өзіндік зерттеулер негізінде жүргізілген жұмыстарға сүйене отырып, биологиялық материалдан *P.multocida*-ның ДНҚ-лын бөліп алудың оңтайлы әдістерін іздестіру нәтижелері келтірілген.

Биологиялық материалдан *P.multocida*-ның ДНҚ-лын бөліп алудың оңтайлы әдістерін іздестіру нәтижелері бойынша анықталғаны – барлық қолданылған әдістер жарамды, дегенімен ДНҚ-ның неғұрлым көп мөлшері гуаниді бар ФХЭ көмегімен бөлініп алынды. *P.multocida*-ның ДНҚ-лының оптикалық тығыздығы қатынасының ( $E_{260}/E_{280}$ ) орташа мәні  $1,7 \pm 0,04$ . Көп кезеңділігі мен ұзақтығына қарамастан бұл әдіс басқа сезімталдығы жоғары және қарапайым әдістерге қарағанда, әсіресе зерттеу жұмыстары сирек кезде, ДНҚ-ның талдамалы мөлшерін бөліп алу үшін оңтайлы әдіс болып табылады.

*Кілт сөздер:* *P.multocida*, бөліп алу, ДНҚ, спектрофотометрия, электрофорез.

K.B. Biyashev, G.D. Chuzhebaeva, Zh.S. Kirkimbaeva, S.E. Ermagambetova,  
R.M. Ryschanova, V.A. Ulyanov

METHODS FOR ISOLATION OF DNA FROM THE SAMPLE PASTEURELLA  
MULTOCIDA BIOLOGICAL MATERIAL FOR USE IN PCR:  
COMPARISON AND EVALUATION

The article presents results of research on the selection of an optimal method of DNA extraction of *Pasteurella* from biological material. By selecting optimum methods for isolation of DNA from biological material, it was determined that all methods used in this study is quite acceptable for extraction with genomic DNA, but the largest quantity of DNA isolated by FHE with guanidine. The ratio of the optical densities ( $E_{260}/E_{280}$ ) of the formulations had an average value of  $1,7 \pm 0,04$ . Despite the multiple layers and the duration of the analysis in comparison with a new sensitive and easy to perform methods of DNA extraction, this method is optimal for analytical isolation of DNA amounts when there is not much flow studies.

*Keywords:* selection, DNA, spectrophotometry, electrophoresis.

УДК 664.6/.7

**Р.Г. Дуйсекенова, Д.А. Шаншарова**

*Казахский национальный аграрный университет*

ТЕХНОЛОГИЯ ПШЕНИЧНОГО ХЛЕБА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОДУКТОВ  
ПЕРЕРАБОТКИ ЭЛИТНЫХ СОРТОВ ЯГОД

**Аннотация**

Перспективность поиска новых видов сырья обусловлена необходимостью удовлетворения возрастающего спроса населения в высококачественных продуктах, расширения ассортимента изделий. Одним из направлений повышения качества и пищевой ценности хлебных изделий является использования для их выработки элитных сортов ягод.