С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «**Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру**» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының **материалдары** = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее»**, посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - **2017. - Т.I, Ч.2. -** С.75-77

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОВЕЦ

Исламов Е.И., Мухаметжарова И.Е.

Достижения современных исследований на молекулярно-генетическом уровне дают возможность идентифицировать гены, контролирующие хозяйственно-полезные признаки сельскохозяйственных животных.

Современная селекция сельскохозяйственных животных всё больше применяет ДНК-технологии, основанные на достижениях молекулярной генетики, позволяющие оценить генотип племенных животных [1, 2].

В этой связи, изучение и оценка генетических ресурсов разводимых пород овец в Казахстане, с применением современных генетических методов является актуальной задачей. Генотипирование животных с помощью молекулярно-генетических методов включает следующие действия: взятие биологического материала (пробы), выделение ДНК, анализ последовательности нуклеотидов и полиморфизма нуклеотидных замен, получение данных о генетической ценности животного, а также прогноза ценности потомства [3].

Одним из основных и первоначальных этапов молекулярно-генетических исследований является процедура выделения ДНК из клеток и тканей [4, 5].

В этой связи нами было проведено исследование по выделению ДНК из биологического материала казахской мясошерстной полутонкорунной породы овец, а также проведен качественный и количественный анализ образцов.

Выделение ДНК включает следующие этапы:

1) лизис клеток;

2) осаждение белков;

3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл;

4) осаждение ДНК из раствора этанолом и после центрифугирования растворение осадка в буферном растворе [4].

Материалом исследования служил биологический материал, полученный от племенных овцематок казахской мясошерстной полутонкорунной породы, разводимых в условиях Чу-Илийских низкогорий и песков Мойынкум Жамбылской области, средняя живая масса, настриг и

длина шерсти которых составили 56,5 кг ±0,15; 4,3 кг ±0,08; 9,0 см соответственно.

Исследования проводились в Научно-инновационном центре при Костанайском государственном университете им. А. Байтурсынова.

В целях проведения исследований, у овец казахской мясошерстной полутонкорунной породы были отобраны образцы ушной ткани площадью 1 см2. Пробы хранились в 70% этиловом спирте при температуре минус 20°С. Выделение ДНК проводилось с помощью метода фенол-хлороформной экстракции (ФХЭ) ДНК с предварительной обработкой протеиназой К.

Первый этап выделения ДНК – лизис, то есть разрушение клеточных мембран. В пробирку 1,5 мл помещали измельченный биологический материал, полученный от овец.

Далее клеточный осадок ресуспендировали в 300 мкл раствора №1 (100 мМтрис-HCl pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 2 мг/мл лизоцима) и инкубировали 60 мин при 37°С. Добавляли 50 мкл раствора №2 (8% додецилсульфат натрия (SDS) и 50 мкл протеиназы К (2 мг/мл). Хорошо перемешивали и инкубировали при 42°С 60 мин. Затем добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали 10 минут 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 (pH 5,4) и 800 мкл 96% этилового спирта, тщательно перемешивали. Инкубировали в течение ночи при – 20°С. ДНК осаждали центрифугированием 15 минут при 12 000 об/мин. Осадок промывали 400 мкл 75% этилового спирта, сушили при 37°С в течение 15 минут и растворяли в 30 мкл воды.

После выделения ДНК проводили качественный и количественный анализ образцов. Качественный анализ проводили при помощи электрофореза в 0,5% агарозном геле в ТБЕ-буфере. Электрофорез проводили в следующем режиме: напряжение 110 вольт, продолжительность 30 минут. Количественный анализ проводился с помощью прибора Qubit 3.0 Fluorometer.

В результате исследований, была выделена ДНК из 20 образцов биологического материала овец казахской мясошерстной полутонкорунной породы, разводимых в КХ «Батай-Шу» Жамбылской области. Количество ДНК варьировало в диапазоне от 10 до 217ng/µL.

Выход ДНК зависит от природы исследуемого биологического материала и обусловлен содержанием ДНК в данной ткани, а также наличием примесей, препятствующих очистке ДНК. ДНК должна содержать минимальное количество примесей (не более 2-3%), что отражается на спектральных характеристиках препаратов А 260 /А 280 [7].

Отношение оптической плотности А260/А280 полученных препаратов нуклеиновых кислот варьировало в пределах от 1,4-1,6, что указывает на

высокую чистоту ДНК. Чистая ДНК должна иметь величину отношения, приближенную к 1,8 [6].

Визуализацию результатов осуществляли с помощью гель-документирующей системы. Результаты качественного анализа (электрофореза) полученного препарата ДНК документировали в виде электронного варианта и распечатали электрофореграммы (рисунок 1).

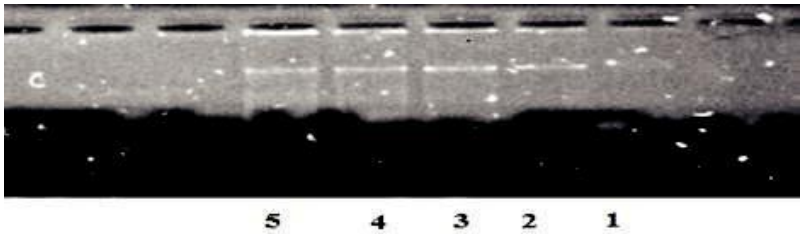

Рисунок 1 – Электрофореграмма выделенной ДНК

Впервые были проведены исследования и отработана методика по выделению нуклеиновых кислот из биологических образцов животных в скороспелом полутонкорунном овцеводстве Казахстана, в том числе казахской мясошерстной полутонкорунной породы овец. Количество выделенной ДНК показало удовлетворительные результаты: варьировало в пределах от 10-217,0 нг/мкл, что является достаточным показателем концентрации выделенных нуклеиновых кислот.

Также была установлена высокая чистота ДНК, которая была определена отношением оптической плотности А 260 /А 280 полученных препаратов ДНК и показала средний коэффициент в пределах 1,4-1,6.

В качестве задач на ближайшую перспективу нами ставится дальнейшее увеличение проб для исследования мясошерстных полутонкорунных овец Казахстана в разрезе различных пород и внутрипородных типов на молекулярно-генетическом уровне.

Список литературы

1 Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева. – М.: Издательство РАСХН, 2008. – 508 с.

2 Гладырь, Е.А. Генотипирование российских пород овец по микросателлитным маркерам и PrP (гену прионового белка) / Е.А.Гладырь, Н.А.Зиновьева, Л.К.Эрнст. // Ветеринарная патология. – 2005. – №1. – С. 26-32

3 Яковлев, А.Ф. Значительное повышение точности оценки племенной ценности животных в молочном скотоводстве / А.Ф. Яковлев, М.Г. Смарагдов. // Зоотехния. – 2011. – №5. – С. 2-4

4 Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: учебно-методическое пособие / В.А. Великов. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник», 2013. – 84 с.

5 Hajibabaei, M. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics / M. Hajibabaei, G.A.C. Singer, P.D.N. Hebert, D.A. Hickey // Trends Genet. – 2007. – № 23. – P. 167–172.

6 Рябушкина, Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. / Н. Рябушкина, М.Е. Омашева, Н. Галиакпаров // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С. 13.

7 Somma, M. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. Session 4. Extraction and Purification of DNA / M. Somma // World Health Organization Regional Office For Europe. – P. 20.