

МРНТИ 68.39.13

DOI <https://doi.org/10.37884/4-2022/04>

Ш. Д. Өрқара, О.О. Жансеркенова, Н.Т. Сандыбаев*

*НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»,
г. Алматы, Казахстан, chingisml@mail.ru*, orik10@yandex.ru, nurlan.s@kaznaru.edu.kz*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ПРИ SNP ГЕНОТИПИРОВАНИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аннотация

В статье представлены результаты сравнения методов выделения при проведении SNP генотипирования крупного рогатого скота (КРС). Успешное проведение генотипирования зависит от получения ДНК из образцов в достаточном количестве и качестве для проведения молекулярных реакций. В работе применялись три метода экстракции нуклеиновых кислот. Методика выделения с использованием коммерческого набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) показала наибольшую степень выхода и чистоты нуклеиновых кислот. При выделении ДНК из волосяных луковиц КРС набором PureLink Genomic DNA Mini Kit средняя концентрация ДНК в образцах составила 151,78 нг/мкл, извлечение ДНК комплектом «ДНК-сорб-В» составила 21,51 нг/мкл и фенол-хлороформный метод соответствовал 175,08 нг/мкл. Экстрагированные ДНК животных в дальнейшем использовали для проведения генотипирования SNP методом. Большинство оцененных методов экстракции позволили амплифицировать значительное количество ДНК. Результаты генотипирования в образцах выделенных с применением PureLink Genomic DNA Mini Kit по сравнению с остальными образцами показали 100 % амплификацию продуктов. Из методов, протестированных в этом исследовании, экстракция данным набором была наиболее эффективной с точки зрения дальнейшего обнаружения ДНК.

Ключевые слова: *выделение, генотипирование, ДНК, животноводство, методы, SNP, крупный рогатый скот.*

Введение

В Республике Казахстан увеличение производства продукции животноводства становятся все более сложными и масштабными. В настоящее время многие хозяйства РК завозят из-за рубежа племенных животных для разведения и улучшения продуктивных качеств существующих пород. Чтобы определить высокопродуктивные качества лучших

пород животных, необходимо выявить их генетический потенциал, используя определённые методы [1-4].

В решении этого вопроса значительную и всевозрастающую роль играют новые молекулярно-генетические методы исследований, которые могут принципиально изменить подходы к раннему прогнозированию не только продуктивных качеств животных, но и диагностике наследственных заболеваний [5].

В мировой практике для подтверждения племенной принадлежности используют современные генетические методы, основанные на анализе ДНК животного. Использование методов ДНК-генотипирования позволяет проводить отбор животных желательных генотипов и корректировку программ разведения молодняка с целью формирования высокопродуктивного, генетически однородного, оздоровленного поголовья племенного скота [6-8].

Определение происхождения племенных животных с последующей выдачей генетического паспорта в Республике Казахстан осуществляется по генетическим маркерам. Для тестирования происхождения крупного рогатого скота (КРС) международным сообществом генетики животных (ISAG) рекомендованы методы, основанные на микросателлитных маркерах (STR) и маркерах однонуклеотидного полиморфизма (SNP).

STR метод в течение двух десятилетий считался основным при генотипировании животных. Однако, существенным недостатком данного метода является погрешность в численности животных с ложными родственными связями, которая достигает до 30% [10].

В настоящее время все мировое сообщество, занимающиеся развитием племенных животных переходит на исследования с применением SNP-маркеров. Преимущества SNP по сравнению с STR заключаются в низкой частоте мутаций, высокой точности и качестве генотипирования, а также широкое распространение в геноме. SNP способны обеспечить более широкий охват генома по сравнению с STR и могут быть использованы для исследования как нейтральных генов, так и генов, находящихся под селективным давлением [11,12].

На сегодняшний день в РК доля племенного поголовья КРС увеличилась на 12,5 %, за счет завоза племенного поголовья зарубежной селекции.

Государственная поддержка племенного животноводства осуществляется как через механизмы кредитования на льготных условиях, так и через субсидирование. При этом субсидируется стоимость как приобретенного отечественного, так и зарубежного скота. Импорт товарного и племенного скота предназначен для обеспечения скотом расширяющегося класса мелких и средних фермеров семейного типа. Сведения по животным заносятся в государственную компьютерную базу «Идентификация сельскохозяйственных животных». Идентификация сельскохозяйственных животных является неотъемлемой частью в животноводстве, от которой зависит развитие отрасли и является одним из условий субсидирования, а также допуска продукции на рынки развитых стран мира.

В Республике Казахстан исследованиями по подтверждению племенного статуса животного, современным методом SNP генотипирования, занимается Казахстанско-Японский инновационный центр (КЯИЦ) при Казахском национальном аграрном исследовательском университете. Университет с 2017 года является институциональным членом ISAG (№134652) и аккредитован по ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 для проведения исследований по генотипированию КРС SNP методом. Участие КЯИЦ в международных сравнительных тестах ISAG по генотипированию КРС показало абсолютную точность проводимых исследований (97-99%).

В соответствии с Законом Республики Казахстан «О племенном животноводстве» № 278 от 9 июля 1998 года (с изменениями и дополнениями по состоянию на 01.07.2021 г.) признание племенного статуса, считается при наличии племенного свидетельства и генетического сертификата животного, выданного аккредитованной лабораторией.

Целью данного исследования является сравнительный анализ экстракции ДНК из волосных луковиц КРС для генотипирования SNP методом, определение эффективности.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены в лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» (ЛЗБиКИ) КЯИЦ КазНАИУ. Лаборатория с 2017 года оказывает услуги Республиканским Племенным палатам по подтверждению происхождения животных. В работе исследовали 23 образца волосяных луковиц крупного рогатого скота.

Доставленные в лабораторию образцы подвергались пробоподготовке: путём промывки в 70% спирте, сушке и отделением волосяных луковиц в пробирки. В ходе исследований были разработаны параметры выделения ДНК из волосяных луковиц. Для получения геномной ДНК использовались три метода выделения: коммерческим набором PureLink Genomic DNA Mini Kit [9] с модификацией, коммерческим комплектом «ДНК-сорб-В» и классическим фенол-хлороформным методом.

Коммерческий набор PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). ДНК из образцов выделяли согласно протоколу производителя, нами был изменён объём буферов. Пробы подвергались лизису в 100 мкл буфера с протеиназой К 20 мкл и помещались в термостат на 20 минут при 56⁰ С. К пробам в пробирках вносили 15 мкл РНКазы, инкубировали 10 минут при 70⁰ С. По истечению времени в пробирки вносили 200 мкл этанола, перемешали на вортексе и 700 мкл пробы переносили в колонку с фильтром. В течении 2 минут пробы центрифугировали при 8000 об/мин. Промывку проб проводили дважды, изменив объём буферов на 400 мкл, при периодическом центрифугировании. В пробирки вносили 50 мкл элюирующего буфера и помещали в термостат на 2 минуты при 70⁰ С, центрифугировали в течении 60 секунд при 13 тыс. об/мин.

Коммерческий комплект «ДНК-сорб-В». Выделение ДНК проводили набором «ДНК-сорб-В» (Россия, Москва), согласно инструкции. Основной принцип твердофазного выделения НК основан на лизисе клеток, отмывках и адсорбцией высвобожденной ДНК, при помощи экстракции буферными растворами.

Фенол-хлороформный метод. В основе метода лежит лизис материала додецилсульфатом натрия (SDS) и деградация белков протеиназой К [9]. Затем образцы обрабатывали смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт. Фенол удаляет из водной фазы белки, а хлороформ – остатки фенола, изоамиловый спирт является пеногасителем. ДНК осаждали с использованием холодного этанола и затем растворяли в Трис-ЭДТА (TE) буфере.

Качественную и количественную оценку выделенной ДНК проводили на спектрофотометре Nano drop 2000. ДНК до нужной концентрации разбавляли деионизированной водой в соотношении 1:6.

Для постановки реакции генотипирования SNP-методом на приборе широкого спектра задач QuantStudio12K Flex OpenArray необходимо количество ДНК от 0,5 до 100 нанограмм/микролитр. Разбавленную ДНК и концентрированную реакционную смесь Master Mix (по 2,5 мкл каждого) вносили в типовую 384-луночную пластину OpenArray®, на 23 образца и один контроль Master Mix с деионизированной водой. Пробы ДНК вносили в две лунки типовой пластины, которую помещали в роботизированную станцию AccuFill™ и запускали программу QuantStudio12K Flex OpenArray. Время анализа длится 3 часа, результаты высвечиваются в виде графика на экране ПК подключенного к прибору. Результаты генотипирования фиксируются прибором, обработка проводится с помощью ПО TagMan. По окончании генотипирования результаты данных вносили в базу ИАС (информационная аналитическая система) РК.

Результаты и обсуждение.

Для сравнительного анализа были отобраны пробы волосяных луковиц крупного рогатого скота, по восемь образцов из трёх хозяйств №1, № 2, № 3 Алматинской области. Доставленные образцы из хозяйства № 1, № 2 были чистые, сухие, тогда как пробы хозяйства № 3 содержали примеси.

Проведя этапы пробоподготовки биоматериалов, выделили ДНК, используя три метода (таблица 1).

Таблица 1 – Количественная и качественная оценка выделенной ДНК КРС

Метод выделения, хозяйства	Концентрация ДНК нг/мкл	Соотношение 260/280 нм	
Коммерческий набор PureLink Genomic DNA Mini Kit, № 1	1	95,5	1,96
	2	94,9	1,69
	3	165,1	1,98
	4	92,0	1,97
	5	210,0	1,91
	6	400,6	1,95
	7	88,9	1,22
	8	67,2	1,65
Коммерческий комплект «ДНК-сорб-В», № 2	9	14,1	2,06
	10	19,10	2,63
	11	26,6	2,03
	12	20,1	2,85
	13	14,10	3,38
	14	17,9	2,75
	15	31,52	2,17
	16	28,6	2,08
Фенол-хлороформный метод (ФХМ), № 3	17	338,10	2,39
	18	147,05	2,19
	19	189,85	2,02
	20	44,93	2,26
	21	99,05	2,02
	22	338,10	2,39
	23	137,44	2,83
	24	106,05	2,06

Качественная и количественная оценка выделенной ДНК (таблица 1) показала разницу при использовании трёх методов и влиянием правил отбора проб на исследование.

При выделении ДНК из волосяных луковиц КРС набором PureLink Genomic DNA Mini Kit средняя концентрация ДНК по группе составила 151,78 нг/мкл, извлечение ДНК комплектом «ДНК-сорб-В» составила 21,51 нг/мкл и фенол-хлороформный метод соответствовал 175,08 нг/мкл.

Качество чистоты (соотношение 260/280 нм) выделенной ДНК тремя способами также показала разницу, степень чистоты проб выделенных первым методом соответствовал для проведения дальнейших исследований.

В результате сравнительного анализа трёх методов выделения ДНК и электрофоретического анализа в агарозном геле (рисунок 1,2,3), наибольшую эффективность при SNP генотипирования КРС показал метод извлечения PureLink Genomic DNA Mini Kit. В дальнейших исследованиях нами использовался данный комплект. Эффективность выделения ДНК с использованием набора «ДНК-сорб-В» оказалась наименьшей, что возможно связано с потерями при многократном переносе жидких фаз в новые пробирки. Несмотря на то, что метод ФХМ даёт хороший результат, он мало пригоден для использования в лабораторной диагностике, из-за трудоёмкости метода, а также из-за токсичности используемых реагентов.

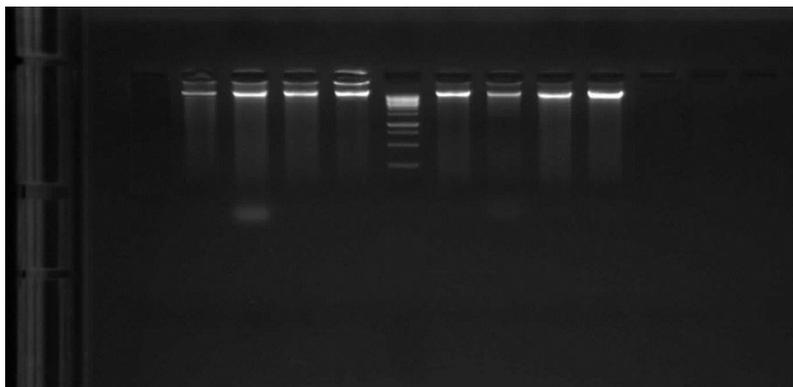


Рисунок 1 – Электрофореграмма ДНК, выделенных методом № 1.

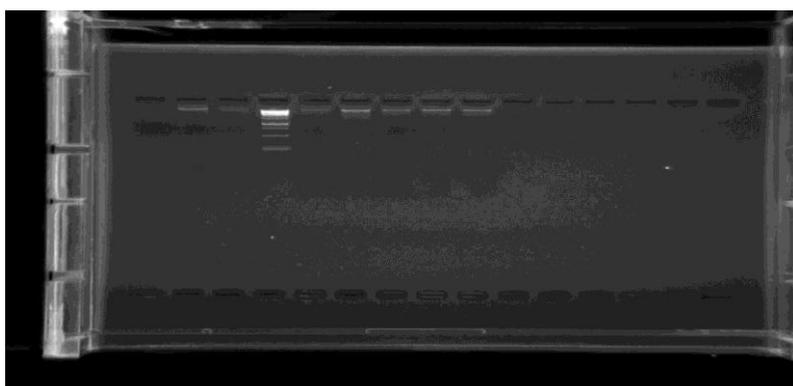


Рисунок 2 – Электрофореграмма ДНК, выделенные методом № 2.

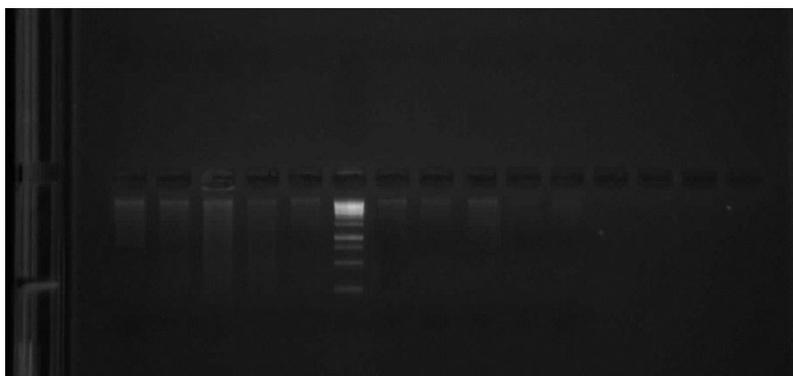


Рисунок 3 – Электрофореграмма ДНК, выделенных методом № 3.

При генотипировании по 120 SNP маркерам ДНК КРС вышеперечисленных хозяйств (рисунок 4) видно, что наибольший процент амплификации продуктов (100 %) при подтверждении происхождения животных показал метод выделения ДНК №1. Использование метода №2 показала чуть меньшие значения, и еще меньше последний метод №3. В целом методика выделения оказывает большую значимость на результаты при проведении генотипирования, но все же, полученные данные вполне достаточны для подтверждения родства у исследованных животных.

Flag Summary		Assays		Experiments		Samples					
#	Sample ID	Sample Call Rate ¹	% S	POX	NTC	NTC	GT	OTL	REF	RPL	
1	1	100%	■	0	0	0	1	0	0	0	0
2	2	100%	■	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	100%	■	0	0	0	1	0	0	0	0
4	4	100%	■	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	100%	■	0	0	0	2	0	0	0	0
6	6	100%	■	0	0	0	0	0	0	0	0
7	7	100%	■	0	0	0	3	0	0	0	0
8	8	100%	■	0	0	0	0	0	0	0	0
9	9	96.7%	■	0	0	0	5	0	0	0	0
10	10	96.7%	■	0	0	0	4	0	0	0	0
11	11	95.8%	■	0	0	0	6	0	0	0	0
12	12	95.8%	■	0	0	0	4	0	0	0	0
13	13	94.2%	■	0	0	0	4	0	0	0	0
14	14	94.2%	■	0	0	0	6	0	0	0	0
15	15	91.7%	■	0	0	0	10	0	0	0	0
16	16	89.2%	●	3	0	0	15	0	0	0	0
17	17	85.8%	●	0	0	0	15	0	0	0	0
18	18	83.3%	●	4	0	0	17	0	0	0	0
19	19	73.3%	●	9	0	0	17	0	0	0	0
20	20	85.8%	●	0	0	0	23	0	0	0	0
21	21	85.8%	●	0	0	0	20	0	0	0	0
22	22	83.3%	●	0	0	0	25	0	0	0	0
23	23	93.3%	■	0	0	0	8	0	0	0	0
24	K	0.0%	●	0	0	0	0	0	0	0	0

Рисунок 4 – Результаты SNP генотипирования КРС, метод: №1 (1-8 sample), №2 (9-15 sample), №3 (16-23 sample), Отрицательный контроль (24 sample)

Выводы

Таким образом, в результате сравнительного анализа было установлено, что для подтверждения происхождения животных SNP методом, наиболее приемлемым для экстракции ДНК и проведения реакции генотипирования КРС является использование набора PureLink Genomic DNA Mini Kit, методика №1. Использование этого метода позволило выделить высокомолекулярную ДНК с оптимальной концентрацией и чистотой, что даёт возможность провести качественный SNP анализ. Недостатком данного метода является дорогая стоимость набора. Использование набора «ДНК-сорб-В» и фенол-хлороформного метода для проведения генотипирования КРС методом SNP показала наименьшую чувствительность.

Список литературы

1. Столповский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domesticированных видов животных. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, т.17, № 4/2, С.901-213.
2. Манцевич Е.А., Епишко О.А., Генотипирование крупного рогатого скота по гену LEP. УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь, 2019 г., С. 146-150.
3. Ганджа А.И., Курак О.П., Леткевич Л.Л., Симоненко В.П., Кириллова И.В., Журина Н.В., Ковальчук М.А. // Генотипирование эмбрионов крупного рогатого скота на основе ДНК-анализа. РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино, Минская обл., Республика Беларусь, 2014.
4. Янич Ф., Влияние полисахаридов на продуктивные качества новотельных коров голштино-фризской породы в условиях тоо «БЕК+». Izdenister Natigeler, (2 (94), С.12–20. 2022 <https://doi.org/10.37884/2-2022/02>.
5. Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А., Истомина А.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных государствах. СПб., 1994, С.473.
6. Моисеева И.Г., Уханов С.В., Столповский Ю.А. и др. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России/Под ред. И.А. Захарова. М.:Наука, 2006. С. 466.

7. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М., 2008. С.505.

8. Fernández, María E. Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd // *Genetics and Molecular Biology* 36, 2, P. 185 – 191 2013.

9. Barker K. Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol (PCI) DNA Extraction / Barker K // *At the bench: a laboratory navigator*. 1st edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998) P. 284–289.

10. Deniskova, T.E., Sermyagin, A.A., Bagirov, V.A. et al. Comparative analysis of the effectiveness of STR and SNP markers for intraspecific and interspecific differentiation of the genus *Ovis*. *Russ J Genet* 52, P. 79–84 (2016).

11. Morin, P.A., Luikart, G., and Wayne, R.K., The SNP workshop group: SNPs in ecology, evolution and conservation, *Trends Ecol. Evol.*, 2004, vol. 19, P. 208– 216. 7.

12. Vignal, A., Milan, D., Sancristobal, M., and Eggen, A., A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics, *Genet. Sel. Evol.*, 2002, vol. 34, P. 275–305.

References

1. Stolpovskij YU.A. Populyacionno-geneticheskie osnovy sohraneniya genofondov domesticirovannyh vidov zhivotnyh. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*, 2013, t.17, № 4/2, S.901-213.

2. Mancevich E.A., Epishko O.A., Genotipirovanie krupnogo rogatogo skota po genu LEP. UO «Grodzenskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet», g. Grodno, Respublika Belarus', 2019 g., S. 146-150.

3. Gandzha A.I., Kurak O.P., Letkevich L.L., Simonenko V.P., Kirillova I.V., Zhurina N.V., Koval'chuk M.A. // Genotipirovanie embrionov krupnogo rogatogo skota na osnove DNK-analiza. RUP «Nauchno-prakticheskij centr Nacional'noj akademii nauk Belarusi po zhivotnovodstvu», g. Zhodino, Minskaya obl., Respublika Belarus', 2014.

4. Yanich F., Vliyanie polisaharidov na produktivnye kachestva novotel'nyh korov golshtinofrizskoj porody v usloviyah too «BEK+». *Izdenister Natigeler*, (2 (94), S.12–20. 2022 <https://doi.org/10.37884/2-2022/02>.

5. Ernst L.K., Dmitriev N.G., Paronyan I.A., Istomin A.A. Geneticheskie resursy sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh v Rossii i sopredel'nyh gosudarstvah. SPb., 1994, S.473.

6. Moiseeva I.G., Uhanov S.V., Stolpovskij YU.A. i dr. Genofondy sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh: geneticheskie resursy zhivotnovodstva Rossii/Pod red. I.A. Zaharova. M.: Nauka, 2006. S. 466.

7. Ernst L.K., Zinov'eva N.A. Biologicheskie problemy zhivotnovodstva v XXI veke. M., 2008. S.505.

8. Fernández, María E. Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd // *Genetics and Molecular Biology* 36, 2, P. 185 – 191 2013.

9. Barker K. Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol (PCI) DNA Extraction / Barker K // *At the bench: a laboratory navigator*. 1st edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998) P. 284–289.

10. Deniskova, T.E., Sermyagin, A.A., Bagirov, V.A. et al. Comparative analysis of the effectiveness of STR and SNP markers for intraspecific and interspecific differentiation of the genus *Ovis*. *Russ J Genet* 52, P. 79–84 (2016).

11. Morin, P.A., Luikart, G., and Wayne, R.K., The SNP workshop group: SNPs in ecology, evolution and conservation, *Trends Ecol. Evol.*, 2004, vol. 19, P. 208– 216. 7.

12. Vignal, A., Milan, D., Sancristobal, M., and Eggen, A., A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics, *Genet. Sel. Evol.*, 2002, vol. 34, P. 275–305.

Ш.Д. Өрқара*, О.О. Жансеркенова, Н. Т. Сандыбаев
«Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КеАҚ, Алматы қ., Қазақстан,
chingism1@mail.ru*, orik10@yandex.ru, nurlan.s@kaznaru.edu.kz

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ SNP ГЕНОТИПТЕУ КЕЗІНДЕ ДНҚ ОҚШАУЛАУ ӘДІСТЕРІН САЛЫСТЫРМАЛЫ БАҒАЛАУ

Аңдатпа

Мақалада ірі қара малдың генотипін SNP жүргізу кезінде оқшаулау әдістерін салыстыру нәтижелері келтірілген. Генотиптеуді сәтті жүргізу үшін жеткілікті мөлшерде және сапалы ДНҚ-ны бөліп алуға байланысты. Бұл зерттеуде нуклеин қышқылдарын бөліп алу үш әдісі қолданылды. Коммерциялық Purelink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) көмегімен бөліп алынған нуклеин қышқылдарының өнімділігі мен тазалығының сапасы ең жоғары болды. PureLink Genomic DNA Mini Kit жиынтығымен ірі қара малдың түк фолликулаларынан ДНҚ оқшауланған кезде үлгілердегі ДНҚ-ның орташа концентрациясы 151,78 нг / мкл құрады, ДНҚ-сорб-В жиынтығымен 21,51 нг/мкл құрады және фенол-хлороформ әдісі 175,08 нг / мкл құрады. Бөліп алынған ДНҚ кейіннен SNP генотиптеу жүргізу үшін қолданылды. Қалған әдістермен салыстырғанда PureLink Genomic DNA Mini Kit көмегімен оқшауланған үлгілер генотиптеу нәтижелері 100% амплификациясын көрсетті. Осы зерттеуде сылыстырған әдістердің ішінен осы жиынтықпен ДНҚ-ны экстракциялау және одан әрі анықтау үшін ең тиімді болды.

Кілт сөздер: оқшаулау, генотиптеу, ДНҚ, мал шаруашылығы, әдістер, SNP, ірі қара мал.

Sh. D. Orkara*, O.O. Zhanserkenova, N.T. Sandybaev
NJSC "Kazakh National Agrarian Research University", Almaty, Kazakhstan,
chingism1@mail.ru*, orik10@yandex.ru, nurlan.s@kaznaru.edu.kz

COMPARATIVE EVALUATION OF DNA ISOLATION METHODS IN CATTLE SNP GENOTYPING

Abstract

The article presents the results of a comparison of isolation methods during SNP genotyping of cattle. Successful genotyping depends on obtaining DNA from samples in sufficient quantity and quality to carry out molecular reactions. Three methods of nucleic acid extraction were used in the work. The method of isolation using a commercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) showed the highest degree of yield and purity of nucleic acids. When DNA was isolated from the hair follicles of cattle with the PureLink Genomic DNA Mini Kit, the average DNA concentration in the samples was 151.78 ng/ml, DNA extraction with the DNA-sorb-B kit was 21.51 ng/ml and the phenol-chloroform method corresponded to 175.08 ng/ml. The extracted animal DNA was later used for genotyping by the SNP method. Most of the evaluated extraction methods allowed amplification of a significant amount of DNA. The results of genotyping in samples isolated using PureLink Genomic DNA Mini Kit compared to other samples showed 100% amplification of products. Of the methods tested in this study, extraction with this set was the most effective in terms of further DNA detection.

Key words: isolation, genotyping, DNA, animal husbandry, methods, SNP, cattle.