

5. Зиновьева Н. Геномная селекция – новая стратегия генетического совершенствования свиней / Н. Зиновьева, А. Сермягин, О. Костюнина // *Животноводство России*. – 2018. – Тематический выпуск. – С. 53–55.
6. Мисникова И.В. Роль нутригеномики в коррекции метаболических нарушений / И.В. Мисникова // *Альманах клинической медицины*. – 2015. – Спецвыпуск № 1. С. 42–45.
7. Племенному животноводству – инновационные, молекулярно-генетические, биотехнические технологии и современные кадры / И.Д. Арнаutowский, Р.Л. Шарвадзе, В.А. Гозулов, Е.В. Талалай // *Дальневосточный аграрный вестник*. – 2017. – № 3 (43). – С. 84–91.
8. Попов В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами / В.В. Попов. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009. – 304 с.
9. Селионова М.И. Геномные технологии в селекции сельскохозяйственных животных / М.И. Селионова, А.-М.М. Айбазов // *Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства*. – Ставрополь: Издательство ФГБНУ ВНИИОК. – 2014. – Том 1. – № 7 (1). – С. 140–145.
10. Селионова М.И. Перспективы использования геномных технологий в селекции овец (аналитический обзор) / М.И. Селионова, М.М. Айбазов, Т.В. Мамонтова // *Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства*. – Ставрополь: Издательство ФГБНУ ВНИИОК. – 2014. – Том 3. – № 7. – С. 107–112.
11. Современная генетика – не допустить отставания! [Электронный ресурс]: <http://www.nsgc.ru/o-kompanii/stati/2-uncategorised/57-sovremennaya-genetika-ne-dopustit-otstavaniya>.
12. Фадеенко Г.Д. Нутригеномика и нутригенетика: возможности практического применения / Г.Д. Фадеенко, Е.Г. Куринная, М.Н. Вовченко // *СУЧАСНА ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЯ* – 2015. – № 6 (86). – С. 7–12.
13. Эпигенетика / Отв. ред. С.М. Закиян; В.В. Власов, Е.В. Дементьева. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. – 592 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ МЕТАГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

¹ЛЕТВИНОВА В.С., ²БАРЕЙКО А.А., ²СИДОРЕНКО А.В., ¹СВЕРЧКОВА Н.В.

¹ ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», г. Минск, Республика Беларусь

² Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

*Проведен сравнительный анализ пяти методик выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости лактирующих коров, различающихся стадией разрушения бактериальных клеток и подходом к экстракции нуклеиновых кислот. Выбран метод, позволяющий получать препараты с высокой чистотой и концентрацией ДНК, без ингибиторов ПЦР, пригодные для использования в молекулярно-генетических исследованиях. **Ключевые слова:** метагеномная ДНК, микробиом, рубцовая жидкость.*

OPTIMIZATION OF METHOD FOR METAGENOMIC DNA ISOLATION FROM RUMINAL FLUID OF LACTATING COWS

¹LETVINOVA V.S., ²BAREIKA H.A., ²SIDARENKA A.V., ¹SVERCHKOVA N.V.

¹ SRPA «Chemical Synthesis and Biotechnology», Minsk, Republic of Belarus

² The Institute of Microbiology of NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

*A comparative analysis of five methods of metagenomic DNA isolation from the rumen fluid of lactating cows, differing in the stage of bacterial cells lysis and nucleic acids extraction, has been carried out. The method, providing DNA samples of high purity and concentration, without PCR inhibitors, suitable for use in molecular genetic studies, was selected. **Keywords:** metagenomic DNA, microbiome, rumen fluid.*

Введение. Микробиота рубца коров представляет сложное сообщество бактерий, архей, грибов, простейших и характеризуется огромным метаболическим потенциалом. Микроорганизмы, обитающие в рубце, обладают целлюлолитической, амилолитической, протеолитической, липолитической активностью, продуцируют органические кислоты, аминокислоты, витамины, обеспечивая животных материалом для пластического и энергетического обмена [1, 2]. Формирование неспецифической

резистентности к инфекционным агентам, а также биологические механизмы, регулирующие уровень продуктивности молочных коров, напрямую связаны с составом микробиоты рубца, который определяется рядом факторов, включая генотип и возраст животного, рацион питания, географический регион и др. [2, 3]. Исследование качественного и количественного состава микробиоты рубца рассматривается как перспективный метод диагностики патологий пищеварительной системы коров, вызванных неправильным кормлением (например, ацидоза) [2, 4].

В настоящее время для анализа микробных сообществ рубца жвачных животных все более широкое распространение получают молекулярно-генетические методы, позволяющие обнаруживать некультивируемые микроорганизмы, которые составляют до 90% рубцовой микробиоты [2]. Одним из важнейших этапов исследования структуры микробиома рубца является выделение метагеномной ДНК. Варьируя параметры экстракции нуклеиновых кислот, можно получить различные результаты, работая даже с одним образцом биоматериала. Это связано с различной эффективностью лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий, архей, а также присутствием в рубцовой жидкости большого количества ингибиторов ферментативных реакций.

К основным критериям оценки качества препаратов ДНК можно отнести количество нуклеиновой кислоты (нг/мкл) и её чистоту. Под чистотой ДНК понимают максимально возможное отсутствие примесей (белков, липидов, полисахаридов, нуклеаз), способных ингибировать протекание полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1].

Цель исследования – оптимизация метода выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости лактирующих коров для последующего анализа микробиома рубца с помощью ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы исследований. Для выделения метагеномной ДНК использовали образцы рубцовой жидкости лактирующих коров, предоставленные РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству». Образцы помещали на хранение при -80°C . Перед выделением ДНК рубцовую жидкость размораживали при комнатной температуре.

Выделение ДНК проводили с помощью пяти методик, различающихся стадией разрушения бактериальных клеток (использование стеклянных шариков, детергентов) и подходом к выделению ДНК (методы ЦТАБ/ДСН, модифицированный фенол-хлороформный метод, коммерческий набор «Нуклеосорб С», ОДО «Праймтех»). Методика 1 включала механическое разрушение бактериальных клеток в рубцовой жидкости с помощью стеклянных шариков (диаметр 1,7-2,1 мм) с последующим выделением ДНК методом ЦТАБ/ДСН или коммерческим набором «Нуклеосорб С». Методики 2 и 4 заключались в предварительном осаждении бактериальных клеток из рубцовой жидкости центрифугированием, их разрушении с помощью стеклянных шариков и последующей экстракции ДНК методом ЦТАБ/ДСН или фенол-хлороформным. Методики 3 и 5 предполагали осаждение бактериальных клеток из рубцовой жидкости центрифугированием, их разрушении с помощью стеклянных шариков, обработку протеиназой К и выделение нуклеиновых кислот методом ЦТАБ/ДСН или набором «Нуклеосорб С».

Измерение концентрации ДНК проводили флуориметрически с использованием флуориметра Quantus (Promega, США) и спектрофотометрически с помощью спектрофотометра NanoPhotometer P330 (Implen, Германия), при этом устанавливали отношения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} для оценки чистоты нуклеиновых кислот. Пригодность нуклеиновых кислот для молекулярно-генетических исследований определяли с помощью ПЦР с универсальными эубактериальными праймерами 8f и 1492r, используя стандартный температурно-временной режим. Продукты ПЦР анализировали электрофоретически.

Выделение геномной ДНК с помощью каждой методики проводили в двух повторностях.

Результаты исследований. Для оптимизации метода выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров проведен сравнительный анализ пяти протоколов, различающихся стадией разрушения бактериальных клеток (использование стеклянных шариков, детергентов) и подходом к выделению ДНК (методы ЦТАБ/ДСН, модифицированный фенол-хлороформный метод, коммерческий набор «Нуклеосорб С»).

Важной характеристикой методики выделения ДНК является концентрация нуклеиновых кислот в получаемом образце. Как видно из данных, представленных в таблице, максимальная концентрация ДНК детектировалась в образцах, выделенных с помощью методик 2 и 4, минимальная – с помощью методики 1 с коммерческим набором «Нуклеосорб С».

Таблица 1 - Качественные и количественные показатели препаратов ДНК, полученных с помощью разных методов экстракции нуклеиновых кислот

Метод выделения	Метод измерения концентрации ДНК, нг/мкл		Спектральные характеристики	
	Флуориметрия	Спектрофотометрия	A 260/280	A 260/230
Методика 1 ЦТАБ/ДСН	96,5±18,5	215,5±41,5	1,884±0,008	1,951±0,004
Методика 1 «Нуклеосорб С»	56,1±1,5	94,3±3,8	2,274±0,047	0,117±0,007
Методика 2	263,4±44,7	912,0±58,0	1,596±0,099	1,500±0,041
Методика 3	88,0±33,8	1755,5±1297,5	1,817±0,009	1,522±0,064
Методика 4	230,3±9,6	61,5±10,5*	1,871±0,028*	2,020±0,197*
Методика 5	86,0±12,3	293,0±29,0	1,760±0,051	1,522±0,231

Примечание. * – значения концентрации ДНК в образцах, выделенных с помощью методики 4, превышала пределы детекции измерительных приборов, поэтому результаты приведены при разведении образцов 100×

Второй важной характеристикой образцов ДНК является их чистота. Отношения поглощений (А) при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм указывают на чистоту препаратов ДНК. Значение отношения 260/280 нм, приблизительно равное 1,8, свидетельствует о «чистой» ДНК, приблизительно равное 2,0 – «чистой» РНК, а значение сильно ниже уровня 1,8 указывает на присутствие примесей в растворе (например, белки, соединения фенольной природы). Другим показателем чистоты образцов ДНК является отношение значений при длинах волн 260/230 нм. Данное соотношение, обычно равное 1,8–2,2, является показателем чистого препарата ДНК. Иные значения свидетельствуют о загрязнении образца компонентами, которые остаются после процедуры экстракции ДНК (хаотропные соли, примеси углеводной природы) [5].

Анализируя данные, представленные в таблице 1, «чистыми» по показателям отношений 260/280 нм и 260/230 нм можно считать образцы, выделенные с использованием методики 4, а также методики 1 в варианте ЦТАБ/ДСН.

При проведении ПЦР с праймерами для амплификации гена 16S рРНК целевые продукты размером 1 500 п.н. в высокой концентрации получены с образцами ДНК, выделенными с помощью методик 2, 3 и 4 (разведение 100×). При использовании в качестве матрицы ДНК, выделенной методикой 1 (варианты ЦТАБ/ДСН и «Нуклеосорб С»), отмечалось образование помимо целевого продукта неспецифических ампликонов. Аналогичные результаты получены с ДНК, изолированной с помощью методики 5. Следует отметить, что при использовании в качестве матрицы неразбавленных образцов ДНК, выделенных методиками 2-4, детектируемые продукты целевого размера не образовывались, что может быть обусловлено ингибированием реакции амплификации высокой концентрацией нуклеиновых кислот.

Закключение. Все тестируемые методы позволяют экстрагировать метагеномную ДНК из рубцовой жидкости лактирующих коров. Оптимальной концентрацией и чистотой характеризуются образцы ДНК, выделенные с помощью методики 4, которая заключается в предварительном осаждении бактериальных клеток из рубцовой жидкости центрифугированием, их разрушении с помощью стерильных стеклянных шариков и последующей экстракции ДНК фенол-хлороформным методом; экстракцию ДНК проводили модифицированным фенол-хлороформным методом.

Литература. 1. *Optimization of DNA isolation and purification methods for molecular genetic analysis of uncultivated microorganisms of cow's rumen / L. Ilina [et al.] // Scientific Journal of the Fergana State University. – 2018. – V. 1, № 3. – P. 20–23.* 2. *Исследование микробиома рубца у овец с использованием молекулярно-генетических методов (обзор) / Е. М. Колоскова [и др.] // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2020. – № 4. – С. 5–26.* 3. *Мирошникова, М. С. Основные представители микробиома рубца (обзор) / М. С. Мирошникова // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103, № 4. – С. 174–185.* 4. *Лаптев, Г. Ю. Микробиом рубца – основа здоровья коров / Г. Ю. Лаптев, Е. А. Йылдырым, Л. А. Ильина // Животноводство России. – 2020. – № 4. – С. 42–45.* 5. *Свирид, А. В. Практикум по дисциплине «Химико-аналитические методы в экологии (БСП)»: учебно-методическое пособие / А. В. Свирид, Ю. Г. Походня. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 76 с.*