

УДК 59.002

DOI: 10.31040/2222-8349-2024-0-4-136-140

СПРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ УШНЫХ ТКАНЕЙ И ХВОСТОВ СВИНЕЙ (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)

© О.В. Чубукова, Л.Р. Хакимова, З.Р. Вершинина, Е.В. Михайлова, О.А. Гусев

Выделение ДНК из образцов тканей является первоначальным этапом в молекулярно-генетических исследованиях сельскохозяйственных животных. В настоящее время в Российской Федерации актуально создание обширных биобанков ДНК для глубокого ретроспективного анализа в целях геномной селекции. В животноводческой отрасли особенно важными являются исследования генома и транскриптома свиней (*Sus scrofa domestica*) для идентификации новых генетических маркеров хозяйственноценных признаков животных и разработки эффективных постгеномных подходов направленной селекции, генетической паспортизации и получения линий с новыми характеристиками. Целью данного исследования было определение и сравнение качества и количества ДНК, полученной из образцов тканей ушных выщипов и хвостов свиней с использованием коммерчески доступного набора методом сорбции на магнитных частицах «Tissue M», Raissol Bio (Россия). В результате оба вида биологических образцов показали высокий выход ДНК, однако максимальные концентрации ДНК наблюдались при использовании образцов хвоста (725.1 нг/мкл) и в целом средний результат был выше (337.2 нг/мкл), чем при использовании ушных выщипов (146 нг/мкл). Спектральные характеристики полученной ДНК также показывали хороший результат в пределах допустимых значений. Проверка качества выделенной ДНК с использованием ПЦР со «случайным» праймером показала его высокое качество и пригодность полученной ДНК для последующих молекулярно-генетических исследований. Таким образом, на основании полученных данных сделан вывод, что хвосты поросят пригодны в качестве биологического материала для выделения качественной геномной ДНК для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: свиноводство, выделение ДНК, набор Raissol Bio, ПЦР-анализ, выщипы тканей ушей, хвосты свиней.

Введение. Свиноводство в России является одной из важнейших стратегических отраслей животноводства для продовольственного обеспечения населения мясными продуктами [1, 2]. При этом свинина является наиболее широко потребляемым мясом в мире, а Россия входит в пятерку крупнейших его производителей. Свинина – наиболее доступный вид мяса, который содержит полноценные и легкоусвояемые белки, незаменимые аминокислоты, что помогает быстро восполнить нехватку питательных и минеральных элементов организму человека [1, 3].

Свиноводческая отрасль сталкивается с многочисленными проблемами, такими как рост издержек производства, инфекционные заболевания животных, их генетические особенности, агрессивное поведение особей и другими [4]. Особенно большую угрозу несут в себе инфекционные болезни свиней, которые наносят огромный экономический ущерб производителям и также могут влиять на здоровье человека [5].

В перспективе потребление свинины в качестве основного мясного продукта будет

ЧУБУКОВА Ольга Вячеславовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: chubukova@bk.ru

ХАКИМОВА Лилия Ралисовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

ВЕРШИННИНА Зилия Рифовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: zilyaver@mail.ru

МИХАЙЛОВА Елена Владимировна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: mikhele@list.ru

ГУСЕВ Олег Александрович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: gaisin.ru@gmail.com

только расти [6]. Для получения качественной продукции в настоящее время в животноводстве наряду с классическими методами селекции активно внедряются геномные и метагеномные технологии [7]. Поэтому особо актуальными становятся вопросы генетических исследований животных. Выделение ДНК является первоначальным этапом молекулярно-генетического анализа сельскохозяйственных животных [8]. Источником биоматериала для выделения ДНК могут служить различные ткани животных, кровь, шерсть, пробы молока, жировая ткань и т.д. Получение некоторых материалов связано с техническими трудностями и обучением специального персонала [9].

В качестве материала для генетического анализа свиней чаще всего используются ушные ткани (выщипы), полученные во время мечения особей [10]. Но недостатками данного метода являются высокая травматичность для животного в результате сильного повреждения ушных раковин, поэтому в настоящее время данный метод используется все реже. Следовательно, возникает необходимость поиска более удобных и простых способов получения биологических образцов для выделения ДНК. В случае свиней альтернативой может стать использование хвостов, удаленных у поросят при купировании вскоре после рождения.

Целью данного исследования было сравнение качества и количества образцов ДНК, полученной из образцов тканей ушных выщипов и хвостов свиней с использованием коммерчески доступного набора.

Материал и методы. Все исследования проводились в 2024 г. Объектом изучения являлись 1–2-суточные поросята домашней свиньи (*Sus scrofa domesticus*) породы Дюрок. ДНК выделяли из образцов ткани уха, полученных методом ушного выщипа и образцов ткани хвоста (всего 20 образцов). Собранные биоматериалы хранили при -80°C . Для выделения использовали коммерческий набор реагентов для выделения ДНК из тканей млекопитающих методом сорбции на магнитных частицах «Tissue M», Raissol Bio (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Фрагмент хвоста, содержащий костную часть и волосяной покров отрезали с помощью стерильного скальпеля. Вес образцов варьировал от 40 до 90 мг. Выделение ДНК проводили в трех повторностях для каждого вида образца. Количество выделенной

ДНК измеряли с помощью спектрофотометра Nano Drop oneC (Thermo Fisher Scientific, США), при этом для оценки чистоты препарата определяли соотношение оптической плотности при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм. Измерения производили в соответствии с протоколом производителя. Качество выделенной ДНК также оценивали с помощью ПЦР с применением «случайного» праймера AFK5'-ACGGTGGACG-3' [11].

Образцы ДНК и продукты ПЦР визуализировали после проведения электрофореза в 1 или 1.5%-ном агарозном геле с бромистым этидием в УФ-свете (0.05 мг/мл).

Результаты и обсуждение. Для большинства генетических исследований необходимы определенные концентрации и высокое качество выделенной ДНК [12]. Так, в требованиях для полногеномного секвенирования на MGI прописано, что концентрация образца должна быть более 1 нг/мкл, а оптимальный показатель соотношения поглощения $A_{260}/A_{280} = 1.6\text{--}2.2$. Увеличение данного показателя указывает на загрязнение РНК, а уменьшение – на загрязнение белком или фенолом. В протоколе по построению библиотек Illumina рекомендована концентрация ДНК ≥ 20 нг/мкл, $OD_{260/280}$ в пределах 1.8–2 [13]. Отношение 260/230 для «чистой» нуклеиновой кислоты равно 2.0–2.2. Если данный показатель ниже, это свидетельствует о присутствии в растворе таких примесей, как ЭДТА, углеводов и других.

Чистоту выделенной ДНК оценивали по отношению оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм. Результаты спектрофотометрических измерений представлены в таблице.

Максимальный выход ДНК наблюдался для образцов хвоста (725.1 нг/мкл), где в целом средний результат был выше, чем при использовании ушных выщипов (337.2 и 146 нг/мкл соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что применение набора «Tissue M», RaissolBio позволяет получить высокий выход ДНК. При этом значения $A_{260}/280$ и $A_{260}/230$ оставались в пределах допустимых значений. Результаты электрофоретического анализа выделенных образцов показали высокую сохранность ДНК при использовании указанного набора (рис. 1). Примеси РНК, которые также присутствовали в образцах, в дальнейшем могут быть удалены обработкой РНКазой.

Сравнительный анализ эффективности экстракции ДНК из тканей свиней

Образцы	Концентрация ДНК, нг/мкл	Спектральные характеристики	
		A260/280	A 260/230
Ушные ткани	118.7±3.3	1.87	1.97
	149.4±2.9	1.84	2.21
	193.3±1.1	1.84	2.20
	147.4±2.7	1.86	1.99
	267.4±3.8	1.91	1.98
Хвосты	165.6±3.5	1.81	2.15
	464.2±5.3	1.88	2.16
	674.5±11.5	1.86	2.13
	668.1±14.7	1.92	2.03
	725.1±18.4	1.90	2.01

П р и м е ч а н и е. Показаны примеры концентраций выделенной ДНК из 5 образцов в 3-кратной повторности.

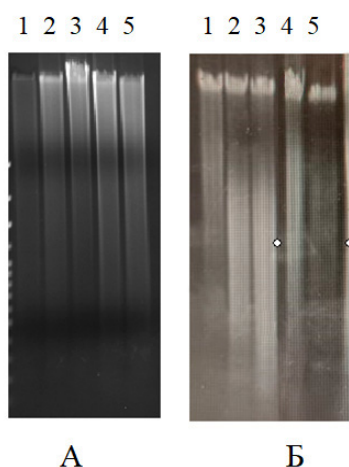


Рис. 1. Электрофореграмма образцов геномной ДНК, выделенной из разных источников: из тканей ушей (А) и хвостов (Б); 1–5 – порядковые номера образцов

Ранее было показано, что использование данного набора, основанного на методе сорбции на магнитные частицы, позволяет получать образцы с высокой концентрацией ДНК из ребра свиньи (в среднем – 474.0 мкг/мл), костных рогов и копыт северного оленя (268.0 мкг/мл и 83.20 мкг/мл, соответственно), хрящевой ткани радужной форели (69.7 мкг/мл) [14].

Для проверки качества полученных образцов ДНК в целях последующего использования в молекулярно-генетических исследованиях был проведен ПЦР-анализ (по принципу RAPD) с применением «случайного» праймера, произвольно залипающего на участках, комплементарных его последовательности. Результатом

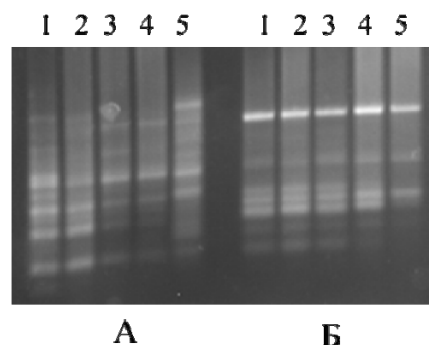


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-анализа со «случайным» праймером: ДНК из тканей ушей (А) и хвостов (Б); 1–5 – порядковые номера образцов

RAPD анализа является набор фрагментов ДНК, который может отличаться у различных организмов вследствие наличия полиморфных участков в одних и тех же локусах геномов (рис. 2).

Результаты показали, что ДНК высокого качества можно выделить как из ушных тканей, так и из хвостов свиней. При этом использование хвостов в качестве исходного материала дает лучший выход геномной ДНК, чем в случае выделения нуклеиновой кислоты из ушного выпячивания.

Заключение. Таким образом, на основании полученных результатов показано, что хвосты поросят пригодны в качестве биообразца

тканей животных для выделения качественной геномной ДНК с использованием коммерчески доступного набора «Tissue M», Raissol Bio (Россия) для дальнейших молекулярно-генетических исследований. Кроме того, использование данного метода, основанного на сорбции на магнитных частицах, по сравнению с другими не требует применения различных кислот, что обеспечивает целостность и стабильность выделенной ДНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2024-666.

Литература

1. Зимняков В.М. Производство свинины в России // Вестник Всероссийского научно-исследовательского института механизации животноводства. 2019. Т. 34. № 2. С. 55–59.
2. Яшина Е.А. Техничко-технологические инновации в свиноводстве // Экономика сельского хозяйства России. 2022. № 6. С. 72–76. DOI: 10.32651/226-72.
3. Романенкова О. С. Костюнина О. В. Диагностика мутации в гене PHKG1, детерминирующей PSE-синдром у свиней // Животноводство и кормопроизводство. 2023. № 4. С. 68–79. DOI: 10.33284/2658-3135-106-4-68.
4. Wang L., Li D. Current status, challenges and prospects for pig production in Asia // Animal Bioscience. 2024. V. 37(4). P. 742. DOI: 10.5713/ab.23.0303.
5. Zhu H., Li X., Chen H., Qian P. Genetic characterization and pathogenicity of a Eurasian avian-like H1N1 swine influenza reassortant virus // Journal of Virology. 2022. V. 19. P. 205. DOI: 10.1186/s12985-022-01936-6.
6. Кравченко В. Производство свинины продолжает расти // Животноводство России. 2021. № 7. С. 23–26.
7. Gu W., Miller S., Chiu C.Y. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection // Annual Review of Pathology. 2019. V. 14. P. 319–338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
8. Yang W., Pu X., Xie W., Li L., Ding Z., Jia L. Isopropanol-promoted DNA extraction by polydopamine functionalized magnetic particles based on metal coordination // Talanta. 2024. V. 275. P. 126115. DOI: 10.1016/j.talanta.2024.126115. Epub 2024 Apr 17. PMID: 38663068.
9. Psifidi A., Dovas C.I., Banos G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk

samples. Molecular and cellular probes. 2010. V. 24. P. 93–98. DOI: 10.1016/j.mcp.2009.11.001.

10. Kunhareang S., Zhou H., Hickford J.G. Rapid DNA extraction of pig ear tissues // Meat Science. 2010. V. 85. P. 589–90. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.02.028.

11. Баймиев Ан. Х., Птицын К. Г., Баймиев Ал.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 123–128.

12. Кулуев А.Р., Матниязов Р.Т., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Выделение геномной ДНК *Nicotiana tabacum* L., обогащенной хлоропластной ДНК с использованием сахарозного градиента // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 2. С. 71–75.

13. Brajković V., Duvnjak I., Ferenčaković M., Špehar M., Raguž N., Lukić B., Curik I., Cubric-Curik V. The effect of DNA quality on the sequencing success of cattle // Journal of Central European Agriculture. 2018. V. 19(4). P. 804–809. DOI: 10.5513/JCEA01/19.4.2340.

14. Филиппова А.В., Рябухина М.В., Одинокоев Г.Н., Карпова Н.Г. Сравнительный анализ эффективности методов экстракции ДНК из тканей животных // Вестник Нижневартковского государственного университета. 2024. Т. 66. № 2. С. 76–85. DOI: 10.36906/2311-4444/24-2/07.

References

1. Zimnjakov V.M. Proizvodstvo svininy v Rossii // Vestnik Vserossiyskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta mekhanizatsii zhivotnovodstva, 2019, vol. 34, no. 2, pp. 55-59.
2. Jashina E.A. Tehniko-tehnologicheskie innovacii v svinovodstve // Ekonomika sel'skogo khozyaystva Rossii, 2022, no. 6, pp. 72-76. DOI 10.32651/226-72.
3. Romanenkova O.S. Kostjunina O.V. Diagnostika mutacii v gene PHKG1, determinirujushhej PSE-sindrom u svinej // Zhivotnovodstvo i kormoproizvodstvo, 2023, vol. 106, no. 4, pp. 68-79. DOI: 10.33284/2658-3135-106-4-68.
4. Wang L., Li D. Current status, challenges and prospects for pig production in Asia // Animal Bioscience, 2024, vol. 37, no. 4, 742 p. DOI: 10.5713/ab.23.0303
5. Zhu H., Li X., Chen H., Qian P. Genetic characterization and pathogenicity of a Eurasian avian-like H1N1 swine influenza reassortant virus // Journal of Virology, 2022, vol. 19, no. 1, 205 p. DOI: 10.1186/s12985-022-01936-6.
6. Kravchenko V. Proizvodstvo svininy prodolzhaet rasti // Zhivotnovodstvo Rossii, 2021, no. 7, pp. 23-26.
7. Gu W., Miller S., Chiu C.Y. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection // Annual Review of Pathology, 2019, vol. 14,

pp. 319–338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.

8. Yang W., Pu X., Xie W., Li L., Ding Z., Jia L. Isopropanol-promoted DNA extraction by polydopamine functionalized magnetic particles based on metal coordination // *Talanta*, 2024, vol. 275, p. 126115. DOI: 10.1016/j.talanta.2024.126115.

9. Psifidi A., Dovas C.I., Banos G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular and cellular probes*. 2010, vol. 24, pp. 93–98. DOI: 10.1016/j.mcp.2009.11.001.

10. Kunhareang S., Zhou H., Hickford J.G. Rapid DNA extraction of pig ear tissues // *Meat Science*. 2010, vol. 85, no. 3, pp. 589–590. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.02.028.

11. Bajmiev An.H., Pticyn K.G., Bajmiev Al.H. Vliyanie introdukcii karagany drevovidnoj na sostav ee kluben'kovykh bakterij // *Mikrobiologiya*, 2010, vol. 79, no. 1, pp. 115–120.

12. Kuluev A.R., Matnijazov R.T., Nikonorov Ju.M., Chemeris A.V. Vydelenie genomnoj DNK *Nicotiana tabacum* L., obogashhennoj hloroplastnoj DNK s ispol'zovaniem saharoznogo gradienta // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAN*, 2018, no. 2, pp. 71–75.

13. Brajkovic V., Duvnjak I., Ferencakovi M., Spehar M., Raguz N., Lukic B., Curik I., Cubric-Curik V. The effect of DNA quality on the sequencing success of cattle // *Journal of Central European Agriculture*. 2018, vol. 19, no. 4. pp. 804–809. DOI: 10.5513/JCEA01/19.4.2340.

14. Filippova A.V., Rjabuhina M.V., Odinokov G.N., Karpova N.G. Sravnitel'nyj analiz jeffektivnosti metodov jekstrakcii DNK iz tkanej zhivotnyh // *Vestnik Nizhnevartovskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2024, no. 2, pp. 76–85. DOI: 10.36906/2311-4444/24-2/07.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DNA EXTRACTION FROM EAR TISSUES AND TAILS OF PIGS (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)

© O.V. Chubukova, L.R. Khakimova, Z.R. Vershinina, E.V. Mikhaylova, O.A. Gusev

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
71, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Extraction of DNA from tissue samples is the initial stage in molecular genetic studies of farm animals. Currently, in the Russian Federation, the creation of extensive DNA biobanks for deep retrospective analysis for the purposes of genomic selection is relevant. In the livestock industry, studies of the genome and transcriptome of pigs (*Sus scrofa domestica*) are especially important for identifying new genetic markers of economically valuable animal traits and developing effective postgenomic approaches to targeted selection, genetic certification and obtaining lines with new characteristics. The purpose of this study was to determine and compare the quality and quantity of DNA obtained from tissue samples of ear notches and tails of pigs using a commercially available kit by the method of sorption on magnetic particles «Tissue M», Raissol Bio (Russia). As a result, both types of biological samples showed a high yield of DNA, however, the maximum DNA concentrations were observed when using tail samples (725.1 ng/μl) and, in general, the average result was higher (337.2 ng/μl) than when using ear notches (146 ng/μl). The spectral characteristics of the obtained DNA also showed a good result within the permissible values. Quality control of the isolated DNA using PCR with a «random» primer showed its high quality and suitability of the obtained DNA for subsequent molecular genetic studies. Thus, based on the data obtained, it was concluded that piglet tails are suitable as biological material for isolating high-quality genomic DNA for further molecular genetic studies.

Keywords: pig farming, DNA extraction, Raissol Bio kit, PCR analysis, ear tissue samples, pig tails.